



**HAL**  
open science

# Drépanocytose et activité physique : conséquences sur les mécanismes impliqués dans l'adhérence vasculaire, l'inflammation et le stress-oxydatif

Émeline Aufradet

► **To cite this version:**

Émeline Aufradet. Drépanocytose et activité physique : conséquences sur les mécanismes impliqués dans l'adhérence vasculaire, l'inflammation et le stress-oxydatif. Education. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2013LYO10007 . tel-01129089

**HAL Id: tel-01129089**

**<https://theses.hal.science/tel-01129089>**

Submitted on 10 Mar 2015

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

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

# Thèse

En vue de l'obtention d'un

## Doctorat de l'Université de Lyon

*Spécialité Science et Technique des Activité Physique et Sportive*

**Présentée par Emeline AUFRADET**

Le 2 Juillet 2012

---

**DREPANOCYTOSE ET ACTIVITE PHYSIQUE: CONSEQUENCES SUR LES MECANISMES  
IMPLIQUES DANS L'ADHERENCE VASCULAIRE, L'INFLAMMATION ET LE STRESS-  
OXYDATIF.**

---

### Membres du jury

Mme L. de Franceschi (Rapporteur)	Professeur	Université de Vérone, Italie
Mr P. Connes (Rapporteur)	MCF-HDR	Université des Antilles et de la Guyane
Mr Y. Colin Aronovicz (Examineur)	DR	Université Paris Diderot
Mme E. Canet-Soulas (Examineur)	PU	Université de Lyon
Mr C. Martin (Directeur)	MCF-HDR	Université de Lyon

---

**Directeur de Thèse :** Dr Cyril Martin

**Ecole doctorale :** Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé

**Equipe de recherche :** Centre de Recherche et d'Innovation sur le Sport (CRIS), EA 64

**DREPANOCYTOSE ET ACTIVITE PHYSIQUE: CONSEQUENCES SUR LES MECANISMES  
IMPLIQUES DANS L'ADHERENCE VASCULAIRE, L'INFLAMMATION ET LE STRESS-  
OXYDATIF.**

Présentée par Emeline AUFRADET

## Remerciements

---

Ce travail a été mené au sein du Centre de Recherche et d'Innovation sur le Sport de l'université Claude Bernard de Lyon. Il n'aurait pas été possible sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes, que je tiens à remercier tout particulièrement.

Je tiens tout d'abord à remercier vivement mon directeur de thèse **Cyril Martin** pour sa très grande disponibilité durant toutes ces années, pour la liberté qu'il m'a toujours laissée, ses conseils avisés et sa bonne humeur.

J'associe aussi à ce travail de thèse le Pr. **Emmanuelle Canet-Soulas**, que je remercie tout d'abord d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse mais aussi d'avoir été présente durant ma thèse avec des remarques et conseils toujours très éclairés. Je remercie aussi **Vincent Pialoux** pour la grande aide qu'il m'a apporté dans les domaines de l'hypoxie et du stress-oxydatif ainsi que pour sa disponibilité.

Je tiens à remercier mes deux rapporteurs le Dr. **Philippe Connes** et le Pr. **Lucia de Franceschi**, d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de venir en discuter malgré la distance. Je remercie également le Pr. **Yves Colin-Aronovicz** pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je souhaite exprimer un très grand merci à toute l'équipe TIGER : **Laurent Bezin**, **Colette Moulin**, **Béatrice George** et **Chantale Bonnet** pour m'avoir accueillie dans mon « deuxième laboratoire » où j'ai pu effectuer la majeure partie de mon travail de paillasse, partager leur vie de laboratoire et bénéficier de tous les conseils dont j'avais besoin.

Ce travail doit aussi beaucoup à **Geneviève** qui nous a apporté ses très utiles connaissances techniques et son agréable compagnie ainsi qu'à **Amine** pour toutes ces années où nos expérimentations communes nous ont fait travailler ensemble.

Je voudrais remercier deux équipes pour leurs aides matérielles et techniques sans qui nous aurions eu plus de mal à mener à bien ces projets. L'équipe de l'animalerie de VALBEX dirigée par **Alain Dorier** chez qui nous avons hébergé nos souris pendant toute la durée des protocoles. Merci à **Emilie Servoz**, **Emeline Lemarie**, **Johann Faucoulanche** et **Laurette**



**Chartier** pour leurs grandes disponibilités. Et merci au Pr. **Alain Francina** et **Philippe Joly** de l'Unité de Pathologie Moléculaire du Globule Rouge pour la réalisation des très nombreux génotypages de souris SAD.

Ce travail ne serait bien évidemment rien sans le soutien sans faille de mes collègues et amis du bureau de physiologie : **Samuel, Sandrine, Mathilda, Aymeric, Damien** et **Baptiste** et du laboratoire : **Camille, Erica, Yoann, Emilie, Jessica, Aude-Marie, Franck**; merci pour tout ces moments de détente ; les pauses quatre heures vont me manquer ! Une mention spéciale pour ma « binôme » de thèse, **Hayet**, depuis le temps que l'on se suit !

Bien évidemment, un très grand merci à ma **famille**, ils ont toujours su me soutenir et m'encourager dans mes choix ce qui m'a permis d'arriver là où je suis.

Enfin, un immense merci à **Arnaud**; la page thèse se fini, place à de nouvelles aventures !

## Table des matières

Figures du manuscrit .....	8
Tableaux du manuscrit .....	9
Index des Abréviations .....	10
<b><u>A. Introduction générale .....</u></b>	<b><u>12</u></b>
<b><u>B. Revue de Littérature .....</u></b>	<b><u>15</u></b>
<b>Partie 1 : Drépanocytose, trait drépanocytaire et modèles de souris transgéniques.....</b>	<b>16</b>
<u>I. Généralités sur la drépanocytose .....</u>	<u>17</u>
I.1. Drépanocytose et hémoglobinopathies .....	17
I.1.i. Hémoglobine normale.....	17
I.1.ii. Anomalies quantitatives de l'hémoglobine : Les thalassémies .....	18
I.1.ii.a. L'α-thalassémie .....	19
I.1.ii.b. La β-thalassémie .....	19
I.1.iii. Les différentes formes de la drépanocytose et apparentées.....	20
I.1.iii.a. La drépanocytose .....	21
I.1.iii.b. Le syndrome drépanocytaire sévère.....	21
I.1.iii.c. Trait drépanocytaire .....	22
I.1.iii.d. L'α-thalassémie, une mutation limitant la sévérité drépanocytaire ?.....	22
I.2. Origine de la drépanocytose.....	23
I.2.i. Historique de la drépanocytose .....	23
I.2.ii. Apparition de la mutation et paludisme .....	24
I.2.iii. Prévalence de la drépanocytose.....	26
I.3. Mécanismes physiopathologiques de la drépanocytose .....	26
I.3.i. La falciformation .....	26
I.3.i.a. Rôle de l'oxygène, du pH, du 2,3 DPG et de la température dans la falciformation des GR .....	27
I.3.i.b. La déshydratation érythrocytaire .....	28
I.3.i.c. Formation de cellules denses et/ou irréversibles et déformabilité érythrocytaire .....	29
I.3.ii. L'hémolyse.....	30
I.3.ii.a. L'hémolyse extravasculaire .....	30
I.3.ii.b. L'hémolyse intravasculaire.....	31
I.3.iii. Les crises vaso-occlusives .....	32
I.3.iii.a. Les modifications des paramètres hémorhéologiques, un facteur important dans la genèse des CVO .....	32
I.3.iii.b. Le cercle vicieux de la drépanocytose.....	35
I.4. Aspects cliniques de la drépanocytose .....	36
I.5. Les traitements de la drépanocytose .....	38
<u>II. Le trait drépanocytaire.....</u>	<u>39</u>
<u>III. Modèles de souris transgéniques drépanocytaires .....</u>	<u>40</u>
III.1. Souris SAD.....	40
III.1.i. Présentation du modèle animal .....	40
III.1.ii. Manifestations physiopathologiques de la drépanocytose humaine chez les souris SAD ...	41
III.1.ii.a. L'espérance de vie.....	41
III.1.ii.b. Les occlusions vasculaires .....	42
III.1.ii.c. La déshydratation des GR et la formation de cellules denses.....	42

III.1.ii.d. Les modifications du tonus vasculaire .....	42
III.2. Souris BERK .....	43
III.2.i. Présentation du modèle animal .....	43
III.2.ii. Manifestations physiopathologiques de la drépanocytose humaine chez les souris BERK .	43
III.3. Autres modèles de souris transgéniques drépanocytaires.....	44
<b>Partie 2 : Vaso-occlusion et drépanocytose, un processus multifactoriel .....</b>	<b>47</b>
<u>I. L'inflammation .....</u>	<u>48</u>
I.1. Présentation de l'inflammation .....	48
I.1.i. Généralités .....	48
I.1.ii. Cytokines .....	51
I.2. Inflammation et drépanocytose .....	53
<u>II. L'adhésion vasculaire .....</u>	<u>57</u>
II.1. Molécules d'adhérence vasculaire .....	57
II.1.i. La super famille des Immunoglobulines.....	57
II.1.ii. Les intégrines.....	58
II.1.iii. Les sélectines et leurs ligands, les mucines .....	59
II.1.iv. Les molécules d'adhérence solubles .....	60
II.2. Adhésion vasculaire et drépanocytose.....	62
II.2.i. L'adhésion GR SS/endothélium .....	62
II.2.ii. L'adhésion leucocytes/endothélium .....	64
II.2.iii. L'adhésion leucocytes/ GR SS.....	65
II.2.iv. Les molécules d'adhérence solubles et drépanocytose .....	67
<u>III. Hémostase et thrombus, à l'interface entre agrégation plaquettaire et cascade de coagulation sanguine.....</u>	<u>68</u>
III.1. Comment se forme un thrombus ? .....	68
III.1.i. Adhésion et agrégation plaquettaire .....	68
III.1.ii. Cascade de coagulation .....	69
III.1.ii.a. L'initiation de la coagulation .....	69
III.1.ii.b. L'amplification de la coagulation .....	69
III.1.ii.c. La propagation de la coagulation .....	70
III.1.ii.d. Régulation du thrombus avec la fibrinolyse.....	71
III.2. Coagulation sanguine et drépanocytose .....	71
<u>IV. Modulation du tonus vasculaire et stress oxydatif .....</u>	<u>73</u>
IV.1. Modulation du tonus vasculaire .....	73
IV.1.i. L'endothéline-1 .....	74
IV.1.ii. L'oxyde nitrique.....	76
IV.1.ii.a. Présentation du NO .....	76
IV.1.ii.b. Diminution de la biodisponibilité du NO .....	77
IV.1.ii.c. Intervention des GR dans la production du NO .....	78
IV.2. Stress oxydatif et défenses antioxydantes .....	79
IV.2.i. Une production de ROS délétère pour l'organisme.....	80
IV.2.ii. Stress oxydatif, adhérence vasculaire et modulation du tonus vasculaire .....	82
IV.3. Drépanocytose, modulation du tonus vasculaire et production de ROS anormale .....	83
IV.3.i. Vasoconstriction exacerbée .....	83
IV.3.ii. Réduction de la biodisponibilité du NO.....	84
IV.3.iii. Stress-oxydatif amplifié .....	87
IV.3.iii.a. Facteurs stimulant la production de ROS chez les patients drépanocytaires .....	88

IV.3.iii.b. Conséquences d'une augmentation du stress oxydatif chez les patients drépanocytaires .....	90
V. Synthèse des éléments impliqués dans la vaso-occlusion.....	90
<b>Partie 3 : Réponse à l'ischémie/reperfusion dans la drépanocytose .....</b>	<b>94</b>
I. Mécanismes mis en jeu dans l'ischémie/reperfusion .....	95
I.1. Ischémie/reperfusion et réponse inflammatoire .....	96
I.1.i. Inflammation et I/R .....	96
I.1.ii. Adhésion vasculaire et I/R .....	97
I.1.iii. Hémostase et I/R .....	97
I.2. Ischémie/reperfusion, stress-oxydatif et modulation du tonus vasculaire .....	99
I.2.i. Stress-oxydatif et I/R .....	99
I.2.ii. NO et IR .....	102
I.2.iii. ET-1 et IR.....	105
II. Réponse à l'ischémie/reperfusion chez les drépanocytaires et souris transgéniques drépanocytaires .....	106
<b>Partie 4 : Exercice physique aigu et chronique, drépanocytose et crises vaso-occlusives .....</b>	<b>109</b>
I. Réponse physiologique à l'exercice aigu et chronique chez les sujets sains et pathologiques .....	110
I.1. Exercice et inflammation .....	110
I.1.i. Réponse inflammatoire à l'exercice aigu .....	110
I.1.ii. Modulation des réponses inflammatoires à l'entraînement.....	111
I.2. Exercice et molécules d'adhérence vasculaire .....	112
I.2.i. Adhérence vasculaire en réponse à un exercice aigu.....	112
I.2.ii. Adhérence vasculaire en réponse à un entraînement physique régulier.....	114
I.3. Exercice et hémostase .....	115
I.3.i. Hémostase et exercice aigu.....	115
I.3.ii. Hémostase et entraînement.....	116
I.4. Exercice et stress oxydatif .....	117
I.4.i. Réponse du stress-oxydatif à un exercice aigu.....	117
I.4.ii. Effets de l'entraînement sur le stress-oxydatif .....	118
I.5. Exercice et modulateurs endothéliaux du tonus vasculaire .....	119
I.5.i. Endothéline-1 .....	119
I.5.ii. Biodisponibilité du NO.....	120
II. Effets de l'exercice aigu ou chronique sur les mécanismes participant aux crises vaso-occlusives chez les sujets porteurs d'hémoglobine S.....	121
II.1. Exercice aigu chez les porteurs du trait drépanocytaire .....	121
II.2. Exercice aigu et/ou chronique chez les sujets drépanocytaires homozygotes .....	125
II.2.i. L'exercice aigu comme outil de diagnostic.....	125
II.2.ii. Réponse à l'exercice aigu et chronique chez les sujets drépanocytaires homozygotes .....	126
<b>C. Contribution Personnelle .....</b>	<b>129</b>
Hypothèse et problématique .....	130
Etude n°1 : Activité physique régulière et activation endothéliale chez les porteurs du trait drépanocytaire .....	134
Etude n°2 : Effets <i>in vivo</i> de l'effet de la roue d'activité chez la souris sur l'anatomie et la fonction cardiaque : étude en imagerie par résonance magnétique nucléaire. ....	144

---

Etude n°3 : Le stress d'hypoxie/réoxygénation stimule certains marqueurs impliqués dans la crise vaso-occlusive chez les souris drépanocytaires SAD .....	154
Etude n°4 : L'activité physique volontaire en roue d'activité prévient l'activation endothéliale et le stress oxydatif en réponse au stress d'hypoxie/réoxygénation chez les souris drépanocytaires SAD.....	176
<b><u>D. Conclusion générale et perspectives .....</u></b>	<b>198</b>
Conclusion générale .....	199
Perspectives .....	201
<b><u>E. Bibliographie .....</u></b>	<b>204</b>
<b><u>F. Annexes.....</u></b>	<b>237</b>
Annexe 1.....	238
Annexe 2.....	248

## Figures du manuscrit

---

Figure 1 : Schéma d'une hémoglobine A.....	18
Figure 2 : Schéma explicatifs des thalassémies $\alpha$ et $\beta$ .....	20
Figure 3 : Schéma de la mutation génétique de la drépanocytose.....	21
Figure 4 : Distribution globale de l'HbS et du paludisme.....	25
Figure 5 : Image prise au microscope électronique (X6000) d'un GR falciforme de souris SAD séquestré dans la rate.....	27
Figure 6 : Image prise au microscope électronique de GR <i>in vitro</i> en condition d'oxygénation ou de désoxygénation.....	30
Figure 7 : Comportement du flux sanguin dans un gros vaisseau lors d'un phénomène de sténose.....	34
Figure 8 : Modélisation générale de la crise vaso-occlusive et des principaux facteurs impliqués dans cette symptomatique.....	36
Figure 9 : Schéma des constructions des gènes $\beta$ SAD et $\alpha$ globine humaine utilisée pour la mise au point de la souris transgénique SAD.....	41
Figure 10 : Image de microscopie électronique de transmission permettant d'observer les interactions endothélium veinulaire/GR dans le muscle crémaster et leurs points de contacts.....	45
Figure 11 : Anatomie d'un vaisseau sanguin.....	49
Figure 12 : Régulation des mouvements leucocytaires par les chimiokines.....	51
Figure 13 : Interactions entre les molécules endothéliales, érythrocytaires et les protéines circulantes menant aux liaisons GR SS/endothélium chez les sujets drépanocytaires.....	63
Figure 14 : Cascade de coagulation d'après le modèle de Monroe et al. en 2002.....	70
Figure 15 : Régulation du tonus vasculaire par l'ET-1.....	75
Figure 16 : Modélisation de la régulation de la biodisponibilité du NO par l'hémoglobine et ses effets vasodilatateurs.....	78
Figure 17 : Système oxydant enzymatique et non-enzymatique.....	82
Figure 18 : Diminution de la biodisponibilité du NO chez les patients drépanocytaires.....	86
Figure 19 : Complexité des interactions pouvant mener aux crises vaso-occlusives.....	92
Figure 20 : Adhésion plaquettaire observée en microscopie intravitale suite à un stress d'I/R.....	98
Figure 21 : Images de veinules postcapillaires post I/R obtenues par microscopie intravitale chez le rat.....	105
Figure 22 : Image prise en microscopie intravitale d'infiltration leucocytaire suite à un stress d'H/R.....	107
Figure 23 : Image d'une coupe histologique d'une veinule présentant une obstruction vasculaire suspectée suite à un stress d'H/R chez une souris drépanocytaire.....	108
Figure 24 : Mort subite et drépanocytose, l'hypothèse de l'hyperkaliémie.....	125
Figure 25 : Effets supposés de l'entraînement sur les paramètres pouvant intervenir dans la crise vaso-occlusive chez les patients drépanocytaires.....	132

## Tableaux du manuscrit

---

Tableau 1 : Etat des concentrations plasmatiques en cytokines pro- ou anti-inflammatoires chez des sujets drépanocytaires à l'état stable comparés à des sujets sains. ....	55
Tableau 2 : Evolution des concentrations plasmatiques en cytokines pro- ou anti-inflammatoires chez des sujets drépanocytaires pendant une CVO comparés à des sujets drépanocytaires à l'état stable ou à des sujets sains. ....	56
Tableau 3 : Caractéristiques des molécules d'adhérence vasculaire endothéliales. ....	58
Tableau 4 : Stress oxydatif chez les patients drépanocytaires et les souris transgéniques drépanocytaires. ....	89
Tableau 5 : Evolution des marqueurs du stress oxydatif et des défenses antioxydantes suite à un stress d'I/R. ....	101
Tableau 6 : Evolution des concentrations et des activités de molécules impliquées dans la modulation du tonus vasculaire. ....	104
Tableau 7 : Evolution des concentrations en molécules d'adhérence solubles en réponse à différents types d'exercices physiques aigus chez des sujets sains ou atteints d'une pathologie.....	113

---

## Index des Abréviations

---

- 2,3, DPG** : 2,3 diphosphoglycérate
- AVC**: Accident vasculaire cérébral
- BH4** : Tétrahydrobioptérine, substrat des NOS
- CCMH**: Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
- CE** : Cellule endothéliale
- CMLV** : Cellule musculaire lisse vasculaire
- CRP** : Protéine c-réactive
- CVO**: Crise vaso-occlusive
- eNOS** : NO synthase endothéliale
- ESL-1** : E-sélectine ligand-1
- ET-1** : Endothéline-1
- GB** : Globule blanc
- GP** : Glycoprotéine
- GPx** : Glutathion peroxydase
- GR AA** : Globules rouges des sujets sains
- GR SS** : Globules rouges des sujets drépanocytaires
- GR**: Globule rouge
- GSH** : Glutathion réduit
- H/R** : Hypoxie/réoxygénation
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène
- Hb**: Hémoglobine
- HbA**: Hémoglobine saine
- HbAA**: Sujets sains, homozygotes pour l'HbA
- HbAS**: Sujets porteurs du trait drépanocytaire, hétérozygotes pour l'HbS
- HbF**: Hémoglobine fœtale
- HbS**: Hémoglobine S drépanocytaire
- HbSS**: Sujets drépanocytaires, homozygotes pour l'HbS
- HTAP** : Hypertension artérielle pulmonaire
- I/R** : Ischémie/reperfusion
- ICAM-1** : Inter Cellular Adhesion Molecule-1



**IL** : Interleukine  
**iNOS** : NO synthase inductible  
**LDH** : lactate déshydrogénase  
**LFA-1** : Lymphocyte Function-associated Antigen-1  
**Lu/BCAM** : Lutheran/basal cell adhesion molecule  
**MDA** : Malondialdéhyde  
**MEC** : Matrice extra cellulaire  
**MP** : Microparticule  
**NFκB**: Nuclear factor kappa B  
**nNOS** : NO synthase neuronale  
**NO** : Oxyde nitrique  
**NOx** : Métabolites nitrite/nitrate  
**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** : Anion superoxyde  
**OH<sup>•</sup>**: Radical hydroxyle  
**PO<sub>2</sub>**: Pression partielle d'oxygène  
**PS** : Phosphatidylsérine  
**PSGL-1** : P-sélectine glycoprotéine ligand-1  
**PTD**: Porteur du trait drépanocytaire  
**ROS** : Espèce réactive de l'oxygène  
**SOD**: Superoxyde dismutase  
**TAT**: Thrombine - antithrombine  
**TF** : Facteur tissulaire  
**TNF** : Tumor necrosis factor  
**tPA** : Activateur tissulaire du plasminogène  
**TSP**: Thrombospondine  
**VCAM-1**: Vascular Cell Adhesion Molecule-1  
**VLA-4**: Very Late Antigen-4  
**VO<sub>2</sub> max** : Consommation maximale d'oxygène  
**VPC** : Veinule postcapillaire  
**vWF** : Facteur von Willebrandt  
**XO** : Xanthine oxydase

# **A. Introduction**

## **générale**

La drépanocytose fait partie de la famille des hémoglobinopathies, maladies génétiques induites par des mutations sur les gènes codant pour l'hémoglobine. Il en résulte une hémoglobine mutée caractérisée par sa capacité à polymériser en situation de désoxygénation et à induire une modification morphologique des GR : la falciformation. Cette modification est initiatrice d'une des symptomatiques les plus problématiques chez les patients drépanocytaires : la crise vaso-occlusive (CVO). Elle consiste en des obstructions des vaisseaux conduisant à une raréfaction de l'approvisionnement en oxygène des organes situés en aval. Cela conduit au développement de symptômes associés, aigus ou chroniques, tels que des épisodes de crises douloureuses, des accidents vasculaires cérébraux, des syndromes thoraciques aigus ou encore de l'hypertension artérielle pulmonaire. Ce phénotype de la drépanocytose est assez fréquent et invalidant chez les sujets homozygotes pour la mutation, tandis qu'il est relativement silencieux chez les sujets hétérozygotes, les porteurs du trait drépanocytaire (PTD). Ces derniers sont en effet considérés comme asymptomatiques bien que présentant dans certains cas, comme en réponse à un exercice aigu, une augmentation du risque de mort subite.

La crise vaso-occlusive chez les sujets drépanocytaires est un processus multifactoriel impliquant entre autre la falciformation érythrocytaire et l'hémolyse, des perturbations hémorhéologiques, l'inflammation, l'adhésion vasculaire, le stress-oxydatif, la thrombogénèse et la modulation anormale du tonus vasculaire. Elle peut être déclenchée par une situation stressante pour l'organisme telle que l'hypoxie, l'acidose, l'hyperthermie ou encore la déshydratation. De plus, le mécanisme de reperfusion peut contribuer à amplifier l'occlusion vasculaire et conduire à une obstruction totale du vaisseau. Dans ce contexte, l'exercice physique aigu apparaît comme un déclencheur potentiel de la CVO, en stimulant plusieurs facteurs impliqués dans les occlusions vasculaires. Il est de ce fait généralement contraindiqué aux sujets drépanocytaires.

Ce travail de thèse se propose d'évaluer si, au contraire d'un exercice aigu peu favorable aux sujets drépanocytaires, la pratique d'une activité physique régulière ne pourrait pas participer à limiter l'activation de facteurs impliqués dans les CVO. Nous avons donc développé des expérimentations chez deux populations : les sujets porteurs du trait drépanocytaire qui peuvent présenter des désordres endothéliaux et microcirculatoires en

réponse à un exercice aigu ; et un modèle de souris transgénique drépanocytaire présentant le déclenchement de CVO suite à un stress d'hypoxie/réoxygénation.

Afin de dresser le cadre théorique des études expérimentales, une revue de littérature composée de quatre chapitres présentera 1) une description détaillée de la pathologie drépanocytaire avec ses origines, ses mécanismes physiopathologiques, les conséquences sur la santé du patient, les moyens thérapeutiques mis à disposition du corps médical pour prendre en charge les patients drépanocytaires ainsi qu'une présentation des modèles de souris drépanocytaires les plus fréquemment décrits dans la littérature; 2) le fonctionnement général des différents mécanismes pouvant participer aux CVO puis la manière dont ils peuvent se manifester chez les drépanocytaires. Cela inclut l'inflammation, l'adhésion vasculaire, la formation de thrombus, le stress-oxydatif et la modulation du tonus vasculaire. Nous verrons ensuite comment ces mécanismes impliqués dans la CVO peuvent être influencés 3) par l'ischémie/reperfusion qui est un mécanisme souvent retrouvé chez les sujets drépanocytaires et 4) par l'exercice aigu et chronique, ce qui permettra d'introduire l'hypothèse de cette thèse.

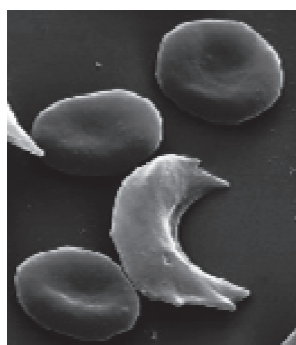
La présentation des résultats expérimentaux de ce travail de thèse se fera ensuite au travers de quatre articles scientifiques. Le premier est réalisé chez des sujets porteurs du trait drépanocytaire entraînés et sédentaires avec pour but d'identifier l'activation endothéliale et la réponse inflammatoire de ces populations au repos et suite à un exercice aigu maximal. Ensuite, deux pré-expérimentations menées chez des modèles murins permettront de concevoir la dernière étude réalisée sur un modèle de souris transgénique drépanocytaire, soumis à une activité physique régulière par roue d'activité volontaire. Nous verrons alors si cette activité physique peut limiter, chez ce modèle, l'hémolyse, l'activation endothéliale et le stress-oxydatif déclenchés par un stress d'hypoxie/réoxygénation.

# B. Revue de Littérature

Partie 1 : Drépanocytose,  
trait drépanocytaire et  
modèles de souris  
transgéniques

## I. GENERALITES SUR LA DREPANOCYTOSE

La drépanocytose est une maladie génétique faisant partie de la famille des hémoglobinopathies. Elle est causée par une mutation génétique qui altère la structure de l'hémoglobine (Hb), molécule fixant l'oxygène au sein des globules rouges (GR) afin d'en assurer le transport jusqu'aux tissus. En situation désoxygénée, cette hémoglobine anormale (HbS par opposition à l'Hb normale : HbA) a la particularité de polymériser, ce qui va entraîner une modification morphologique des GR qui vont alors adopter une forme beaucoup plus longiligne, arquée et rigide ressemblant à une faucille: c'est ce qu'on appelle



la falciformation des GR (cf. ci-contre la photo prise au microscope électronique où on peut voir 3 GR normaux et un GR falciforme). Ce processus est l'élément déclencheur de la symptomatologie des patients drépanocytaires qui consiste notamment en des obstructions de capillaires plus ou moins importantes et qui peuvent dériver sur des crises vaso-occlusives (CVO) avec obstruction totale du vaisseau. Il en résulte d'importantes douleurs causées par l'absence d'oxygénation des tissus situés en aval de l'occlusion (poumons, rate, reins, système digestif, muscles, doigts ...).

### I.1. DREPANOCYTOSE ET HEMOGLOBINOPATHIES

#### I.1.i. HEMOGLOBINE NORMALE

L'hémoglobine humaine est une molécule tétramérique constituée d'un assemblage de 4 groupements ; chacun comprend une protéine globulaire (la globine) et un hème, qui est un anneau présentant en son centre une molécule de Fer pouvant lier une molécule d'oxygène de manière réversible (figure 1). Une Hb peut donc lier jusqu'à 4 molécules d'oxygène (1).

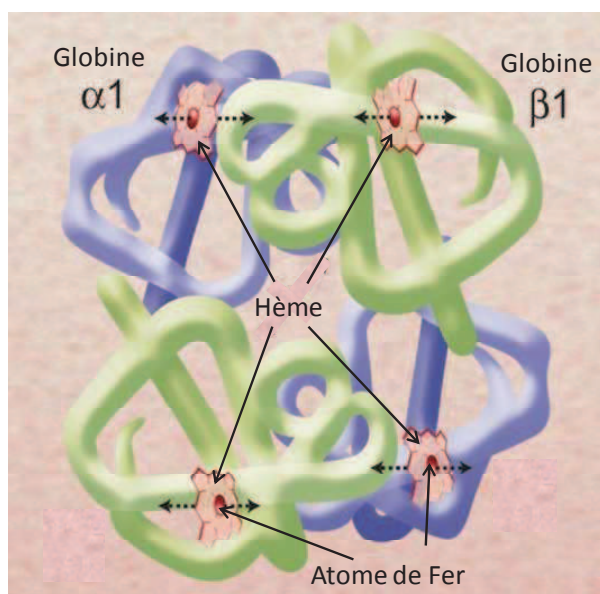
Il existe chez l'Homme différents types de globine (essentiellement  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) qui, associées entre elles, forment différents types d'Hb. On en distingue majoritairement 3 types :

- L'HbF (Hb fœtale) : elle représente plus de 90% de l'Hb totale chez le fœtus et a une affinité très importante pour l'oxygène (supérieure à l'HbA). Elle est composée de 2

globines  $\alpha$  et 2 globines  $\gamma$  ( $\alpha 2\gamma 2$ ). Pendant la période post-natale, cette Hb est remplacée par l'HbA pour ne représenter plus que 1% de l'Hb totale chez les adultes (2-4) . L'HbF est très importante pour les fœtus drépanocytaires car elle permet de limiter la polymérisation de l'HbS, ce qui permet un développement *in-utéro* du fœtus qui ne sera pas altéré par la présence d'HbS (5). Il existe chez certains patients drépanocytaires une persistance de l'HbF à l'âge adulte qui leur confère un phénotype beaucoup moins sévère de la pathologie (6).

- L'HbA : c'est l'Hb majoritairement présente chez l'adulte (97%). Elle est constituée de 2 globines  $\alpha$  et 2 globines  $\beta$  ( $\alpha 2\beta 2$ ) (4). Dans les hémoglobinopathies telles que la drépanocytose, c'est cette Hb qui est mutée au niveau de la protéine  $\beta$  globine et qui acquière un fonctionnement anormal.

- L'HbA<sub>2</sub> ( $\alpha 2\delta 2$ ): Hb assez rare chez l'Homme puisqu'elle ne représente que 2% de l'Hb totale (4). Cette Hb a la particularité de ne pas pouvoir transporter l'oxygène (7).



**Figure 1 : Schéma d'une hémoglobine A.**  
On peut observer 2 globines  $\alpha$  et 2 globines  $\beta$  plus 4 hèmes contenant chacun un atome de Fer qui assure la fixation de l'oxygène. Image tirée de Schetchter A (4).

### I.1.ii. ANOMALIES QUANTITATIVES DE L'HEMOGLOBINE : LES THALASSEMIES

Le mot thalassémie regroupe une grande variété de mutations de l'Hb qui résultent en une grande diversité de symptômes allant des formes légères à très sévères. Le lien commun est l'absence de synthèse d'un type de globine ou sa production incomplète ; aussi bien pour la globine  $\alpha$  ( $\alpha$ -thalassémie) que la  $\beta$  ( $\beta$ -thalassémie) (4). Les thalassémies sont fréquentes dans des zones géographiques bien définies qui présentent des similarités avec celles de la



drépanocytose : Afrique sub-saharienne, région méditerranéenne, Moyen-Orient, le continent Indien et l'Est et le Sud-est de l'Asie. Il semblerait aussi que certaines formes de thalassémie offrent une protection contre des complications liées à l'infection par le paludisme (8).

#### I.1.ii.a. L' $\alpha$ -THALASSEMIE

Au sujet de l' $\alpha$ -thalassémie, l'absence plus ou moins importante d' $\alpha$  globine fonctionnelle peut conduire à la formation de nouvelles hémoglobines ayant beaucoup plus d'affinité pour l'oxygène que l'HbA, les rendant ainsi très peu fonctionnelles. Présent à l'âge adulte, l'HbH est composé de 4 globines  $\beta$  tandis que durant la vie foetale, l'Hb Barth's est composé de 4 globines  $\gamma$  (8). La forme sévère de la maladie, à savoir une absence de globine  $\alpha$  ( $\alpha^0$ ), est rarement viable (7). Pour les autres formes, il est courant d'observer des anémies microcytaires ou hémolytiques (7) (figure 2).

#### I.1.ii.b. LA $\beta$ -THALASSEMIE

Les principaux symptômes de la  $\beta$ -thalassémie sont causés par un excès de globine  $\alpha$ , qui apparait en réponse aux faibles concentrations de globine  $\beta$ . Cette molécule est assez instable et a tendance à précipiter, ce qui induit des anémies plus ou moins marquées selon l'importance des mutations, ainsi que des splénomégalies<sup>1</sup> pour certaines formes sévères de la maladie (7) (figure 2).

La  $\beta$ -thalassémie présente plusieurs formes (9) :

❖ Le trait  $\beta$ -thalassémique : mutation sur un seul des deux gènes codant pour la  $\beta$  globine ; se caractérise par des anémies légères voir absentes et des microcytoses variables ; cette forme est souvent asymptomatique.

❖  $\beta$ -thalassémie intermédiaire ( $\beta^+$ ) : mutation sur les deux gènes codant pour la  $\beta$  globine et au moins une des deux mutations est modérée ; les sujets atteints présentent des anémies légères à modérées, des splénomégalies, des déformations osseuses ainsi qu'une surcharge en fer dépendante des anémies.

---

<sup>1</sup> Splénomégalie : augmentation de la taille de la rate

❖  $\beta$ -thalassémie majeure ( $\beta^0$ ): mutation sévère sur les deux gènes codant pour la  $\beta$  globine ; les manifestations cliniques sont une anémie et surcharge en fer sévères, ainsi que des splénomégalies et déformations osseuses dépendantes de l'efficacité de la transfusion.

❖  $\beta$ -thalassémie à HbE: un gène de la  $\beta$  globine porte une mutation thalassémique légère ou sévère et l'autre porte la mutation codant pour l'HbE ; se caractérise par des anémies légères à sévères et une surcharge en fer dépendante des anémies et des transfusions, des splénomégalies et des déformations osseuses.

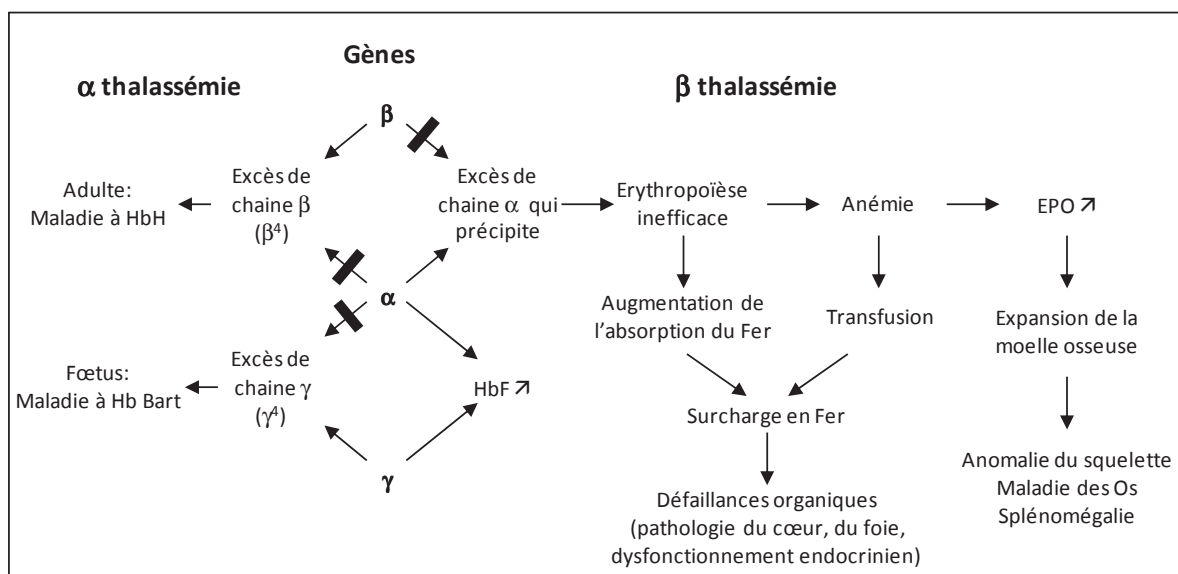


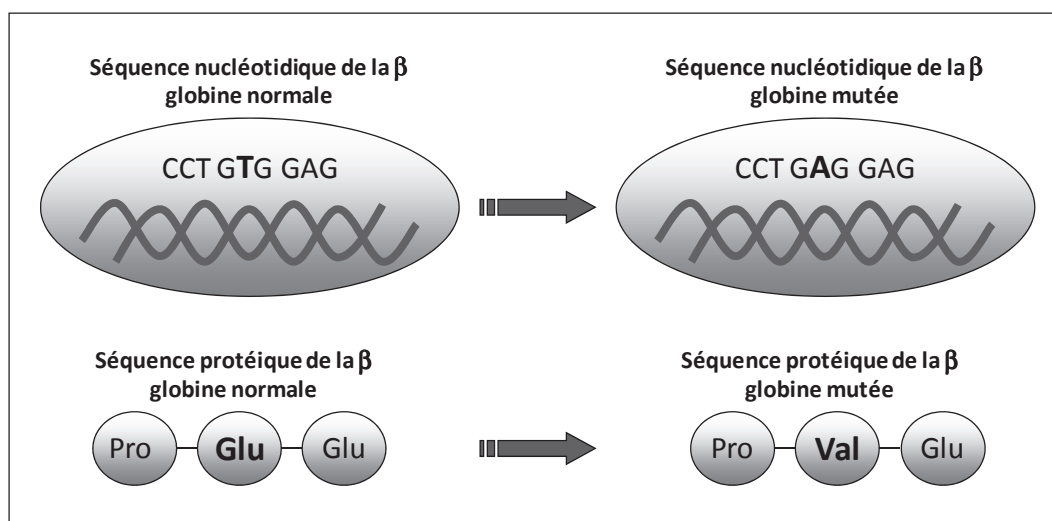
Figure 2 : Schéma explicatifs des thalassémies  $\alpha$  et  $\beta$ .

Schéma traduit de Birgens et al. (7).

### I.1.iii. LES DIFFERENTES FORMES DE LA DREPANOCYTOSE ET APPARENTÉES

La drépanocytose est une pathologie génétique causée par une unique substitution au niveau du 6<sup>ème</sup> codon du gène de la  $\beta$  globine (chromosome 11) où une thymine a été remplacée par une adénine (GTG  $\rightarrow$  GAG). Cela se répercute sur la séquence protéique nommée globine  $\beta^S$  (S pour « Sickle », faucille en français, qui est la forme des GR drépanocytaires), avec le remplacement de l'acide glutamique par la valine (10) (figure 3). Les conséquences de cette mutation sont l'apparition d'un site hydrophobe au niveau de la globine  $\beta^S$  lorsqu'elle est désoxygénée qui va alors se lier à un site hydrophobe d'une autre  $\beta^S$ , entraînant ainsi, par liaisons successives, la polymérisation de l'HbS (11). Il s'en suit une déformation du GR, sous la contrainte de l'HbS polymérisée, qui va devenir beaucoup plus

longiligne. C'est la falciformation des GR qui va alors initier toute la symptomatique drépanocytaire.



**Figure 3 : Schéma de la mutation génétique de la drépanocytose.**

Il s'agit d'une mutation ponctuelle intervenant au niveau du codon 6 de la  $\beta$  globine (chromosome 11), qui conduit à une substitution de l'acide glutamique par la valine. Cette mutation est responsable de la polymérisation de l'hémoglobine mutée (nommée HbS) et des pathologies qui en découlent (crise vaso-occlusive). D'après Okpala et al., 2006 (12).

#### I.1.iii.a. LA DREPANOCYTOSE

Les personnes atteintes de drépanocytose ou « sickle cell disease » en anglais, qui correspond à la forme sévère de la maladie, sont homozygotes pour la mutation  $\beta^S$ . Leurs GR contiennent 97% d'Hb mutées appelées HbS, composées de 2 globines  $\alpha$  et 2 globines  $\beta^S$  ( $\alpha_2\beta^S_2$ ). Leur phénotype est donc HbS/HbS ou encore HbSS.

#### I.1.iii.b. LE SYNDROME DREPANOCYTAIRE SEVERE

D'autres personnes, présentant des caractéristiques génotypiques différentes, peuvent aussi souffrir d'un syndrome drépanocytaire sévère, proche de la symptomatique de la drépanocytose :

- ❖ HbSC: le patient est hétérozygote pour l'HbS et hétérozygote pour l'HbC. La mutation  $\beta^C$  est la substitution de l'acide glutamique par la lysine en position 6 du gène de la  $\beta$  globine soit au même endroit que la mutation  $\beta^S$ . Le phénotype des sujets porteurs HbSC est HbS/HbC soit environ 50% de chaque Hb (13). Les sujets HbSC représentent entre 25 et 30% des personnes atteintes de syndrome drépanocytaire et expriment une sévérité

moyenne de la pathologie drépanocytaire. Cette sévérité est surprenante car pris indépendamment, le trait HbS et le trait HbC sont très peu sévères. Ce paradigme peut s'expliquer par la présence de l'HbC qui augmente la déshydratation des GR, ce qui favorise la polymérisation des GR et donc augmente la sévérité de la maladie (14).

❖ HbS/ $\beta$ -thalassémie : hétérozygote pour l'HbS et hétérozygote pour une mutation de la  $\beta$ -thalassémie ; la sévérité de cette forme dépend de la sévérité de la mutation  $\beta$ -thalassémique. Dans le cadre d'une association entre la mutation  $\beta^S$  et une mutation thalassémique  $\beta^0$ , la forme de la maladie est très sévère et ne présente pas de différence avec celle de la drépanocytose (13).

❖ HbS/HbD<sup>-punjab</sup> ; HbS/HbO<sup>-arabe</sup> ; HbC/HbS-Antille : toutes ces formes sont assez rares et correspondent à une forme moyenne à sévère du syndrome drépanocytaire (11).

#### I.1.iii.c. TRAIT DREPANOCYTAIRE

Les sujets porteurs du trait drépanocytaire (PTD) présentent la forme légère de la drépanocytose qui est souvent considérée comme asymptomatique (cf. partie 1.II ; p36). Ils expriment la mutation  $\beta^S$  de manière hétérozygote, si bien qu'ils expriment moins de 50% d'HbS. Leur phénotype est nommé HbAS ou HbA/HbS.

#### I.1.iii.d. L' $\alpha$ -THALASSEMIE, UNE MUTATION LIMITANT LA SEVERITE DREPANOCYTAIRE ?

L' $\alpha$ -thalassémie, sous sa forme la plus répandue d'une micro-délétion de 3,7 kilobases sur l'un des deux gènes codant pour l' $\alpha$  globine (15), est une mutation très présente dans la population Afro-Américaine avec 30% de la population portant la forme silencieuse (3  $\alpha$ -globine fonctionnelles :  $-\alpha/\alpha\alpha$ ) et 2,5% portant la forme de trait (2  $\alpha$ -globine fonctionnelles :  $-\alpha/-\alpha$ ) (16). Lorsqu'elle est associée à la mutation HbS, une réduction des symptômes drépanocytaires hémolytiques est fréquemment observée (16-18). En effet, ces sujets présentent une diminution des réticulocytes et une augmentation de la quantité d'hémoglobine S (19-20). Ils présentent de plus une diminution du CCMH (concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine) associée à une diminution des GR très denses et des drépanocytes irréversibles (15,19). Ces différences pourraient s'expliquer par une diminution des mouvements ioniques au niveau de la membrane des GR (21).

Enfin, les enfants HbSS/ $\alpha$ -thal semblent présenter des risques de développer des accidents vasculaires cérébraux (AVC) limités (par rapport aux patients non thalassémiques), au regard d'une fréquence inférieure de doppler transcrâniens anormaux (16).

Le rôle totalement bénéfique de l' $\alpha$ -thalassémie chez les patients HbSS a récemment été remis en cause. En effet, il semblerait que la limitation des symptômes liés à l'hémolyse soit contrebalancée chez ces sujets par d'autres désordres de type plutôt vaso-occlusifs (CVO aigu, syndrome thoracique aigu, ostéonécrose) (18,22-25)

## **I.2. ORIGINE DE LA DREPANOCYTOSE**

### **I.2.i. HISTORIQUE DE LA DREPANOCYTOSE**

Les premières traces d'une étude scientifique décrivant des personnes drépanocytaires date de 1846 avec une observation du Dr Lebbey. Celui-ci relate une autopsie pratiquée sur un homme ayant souffert de fièvre intermittente et qui présente post-mortem une absence de rate. Cette même observation est faite en 1898 par Hordenpyl suite à une autopsie sur un homme qui présentait de fortes douleurs dans tout le corps ainsi qu'une jaunisse et une pleurésie (26).

C'est Herrick, en 1910, qui a décrit le premier cas d'un patient présentant des GR déformés, longilignes et ayant une forme de faucille qu'il nommera « Peculiar Elongated and Sickle-shaped Red Blood Corpuscles » (27). Suite à plusieurs cas rapportés dans la littérature, Vernon Mason attribua le nom de « Sickle cell anemia » à cette symptomatique en 1922 (28).

Les avancées sur la compréhension du mécanisme de falciformation sont apparus dès 1917 avec Emmel qui observa que ces GR en forme de faucille, une fois exposés à l'air libre, reprenaient une forme arrondie spécifique d'un GR normale (29). La relation entre falciformation de ces GR et basse pression d'oxygène fut conclue par Hahn et Gillepsie en 1927 (30) et en 1940, Sherman (31) montra que ces processus de falciformation existaient *in vivo* dans l'organisme et qu'ils se produisaient majoritairement dans le sang veineux (29).

En 1933 apparaît la notion de trait drépanocytaire qui fait référence à des personnes présentant de la falciformation des GR mais pas d'anémie (32). Deux études sont venues appuyer cette notion en 1949 : celle de Neel qui a démontré une transmission mendélienne de la drépanocytose avec la présence du gène responsable de la falciformation à l'état

hétérozygote chez les porteurs du trait drépanocytaire et à l'état homozygote pour les drépanocytaires (33) ; et celle de Pauling et al. qui ont observé une différence de migration électrophorétique entre des sujets porteurs du trait drépanocytaire (deux tracés: un pour l'HbA et l'autre pour l'HbS) et des sujets drépanocytaires (un seul tracé pour l'HbS) (34).

Enfin, la caractérisation moléculaire de la mutation de la drépanocytose a été faite par Ingram en 1957 qui démontra que la différence entre l'HbA et l'HbS était due à une substitution de l'acide glutamique par la valine (10). Il émit aussi l'hypothèse que cette substitution d'un acide aminé pourrait s'expliquer par le remplacement d'une base azotée sur l'ARNm codant pour l'HbS. Cela fut confirmé en 1977 par Moratta et al. qui définirent la mutation de l'HbS comme une substitution de l'adénine pour l'uracile sur le codon 6 de l'ARNm codant pour la  $\beta$  globine (GAG-codant pour l'acide glutamique- devenant GUG-codant pour la valine) (35). Finalement, en 1978, Deisseroth localisa le gène de la  $\beta$  globine sur le chromosome 11 (36).

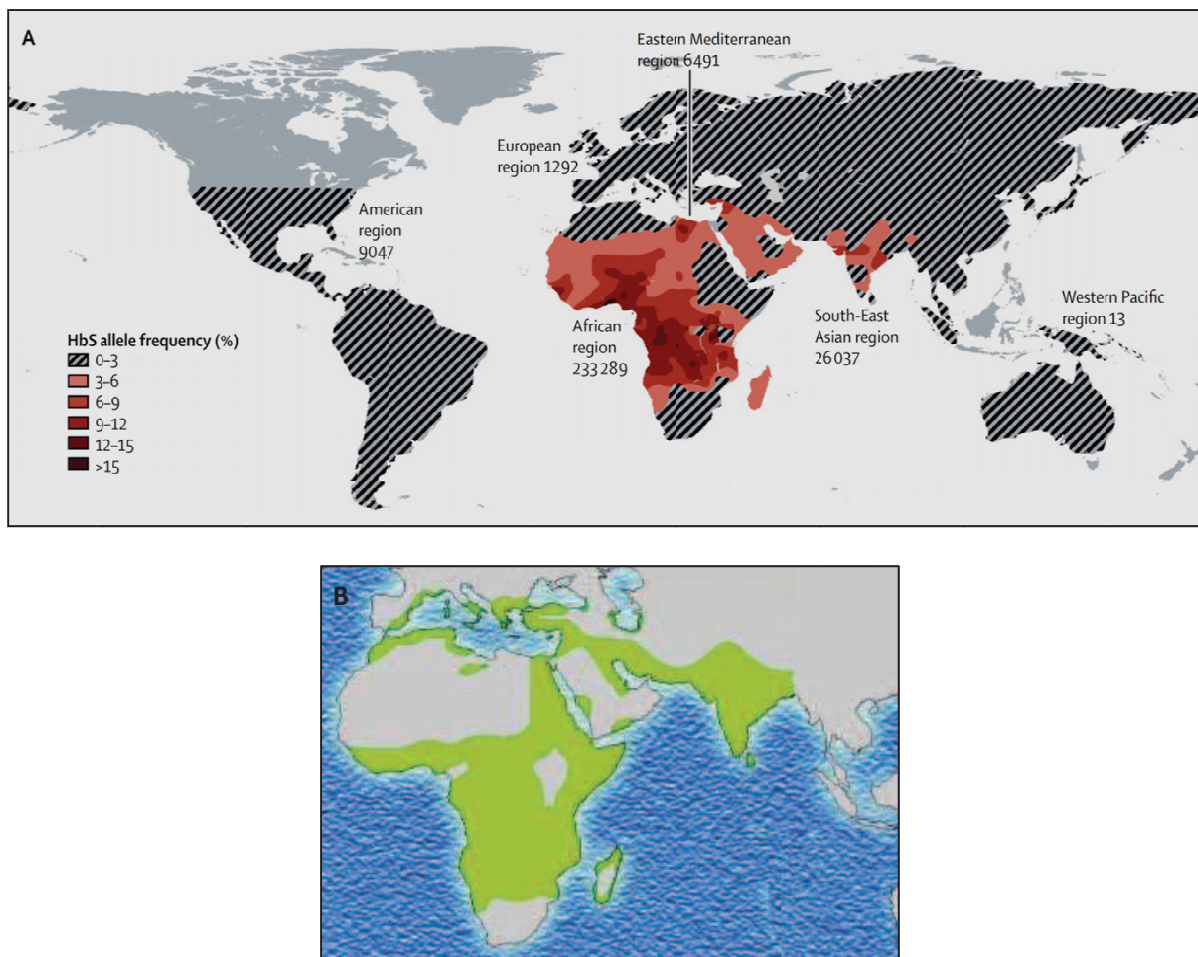
Il faudra attendre plus de 80 années après la première description de la drépanocytose par Herrick pour voir apparaître le premier médicament capable de prévenir les complications de cette pathologie génétique: l'hydroxyurée en 1995 (37).

### I.2.ii. APPARITION DE LA MUTATION ET PALUDISME

La répartition de la drépanocytose à l'échelle mondiale (figure 4 A) permet de visualiser plusieurs sites de fortes concentrations de l'HbS qui se trouvent être des lieux de départ de la mutation. Chacun de ces lieux est caractérisé par un haplotype particulier: il en existe quatre en Afrique (haplotype du Sénégal, Benin, Bantu et Cameroun) et un Arabo-Indien ce qui laisse à penser que l'apparition de la mutation HbS s'est faite au minimum en 2 endroits simultanément (11).

L'apparition des haplotypes en divers points du globe pourrait être expliquée par l'analyse des similarités de localisation entre la drépanocytose et le paludisme (pathologie due à l'infection par le parasite *plasmodium falciparum*) (figure 4 B). On remarque alors une assez forte co-localisation géographique des deux pathologies. En parallèle, il semblerait que la forte prévalence du trait drépanocytaire, qui ne peut être expliquée par le jeu des mutations hasardeuses et le fort taux de létalité de la drépanocytose SS, laisse à penser que l'HbS hétérozygote pourrait conférer un avantage sélectif comparé à une absence de trait.

Cela confirmerait donc l'aspect bénéfique que confère le trait par rapport au plasmodium (38). L'étude menée par Aidoo et al. tendrait à confirmer cette position, à savoir que sur une importante cohorte de jeunes sujets HbAA (sujets homozygote pour l'HbA), HbAS et HbSS (les plus sujets aux décès causés par le paludisme), la présence d'HbS semblerait limiter les épisodes d'anémie sévère causée par le paludisme ainsi que la multiplication du parasite dans les GR (39). De plus, il semblerait y avoir une diminution de la mortalité infantile chez les enfants PTD qui pourrait s'expliquer par un effet bénéfique de l'HbS sur les formes sévères et mortelles du paludisme (39-40).



**Figure 4 : Distribution globale de l'HbS et du paludisme.**

(A) Cette carte montre la distribution de l'allèle HbS (HbSS, HbSC, et HbS/ $\beta$ -thalassémie) en fonction de sa fréquence d'apparition. D'après Rees et al. (11); (B) Cette carte montre la distribution du paludisme en vert dans le bassin méditerranéen et l'Afrique.



La protection conférée par l'HbS au *plasmodium falciparum* pourrait s'expliquer par des mécanismes spécifiques de la présence d'HbS :

- ❖ Il a été observé, chez les PTD, que les GR infectés polymérisent beaucoup plus rapidement que les non infectés, via entre autre un pH plus acide et une perte plus importante de K<sup>+</sup> en situation de désoxygénation, ce qui semblerait provoquer la mort des parasites (41) ou leur destruction par le système immunitaire inné (40,42-43).
- ❖ l'immunité acquise pourrait neutraliser l'évolution des parasites (44-45).

### I.2.iii. PREVALENCE DE LA DREPANOCYTOSE

Jusqu'à la moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, la présence d'HbS se cantonnait essentiellement aux zones de paludisme ainsi qu'aux zones ayant connues un afflux d'esclaves africains durant la traite des noirs. Puis, l'augmentation des flux migratoires, ces dernières décennies, en direction des zones industrialisées ont fortement participé à la dissémination de l'HbS sur une très grande partie du globe (partie rayé de la Figure 4 A) (46).

Cela a participé à placer la drépanocytose comme la pathologie génétique la plus représentée de par le monde. Le nombre de personnes atteintes de mutation drépanocytaire est estimé par l'OMS à 120 millions de personnes soit 2,3% de la population mondiale. En France, en 2004, le nombre de sujets atteints du syndrome drépanocytaire majeur était estimé entre 6 000 à 7 000 personnes et le taux de naissance de nouveaux nés drépanocytaires en Ile de France est d'environ 1,8%, ce qui correspond à environ 200 naissance par ans (46).

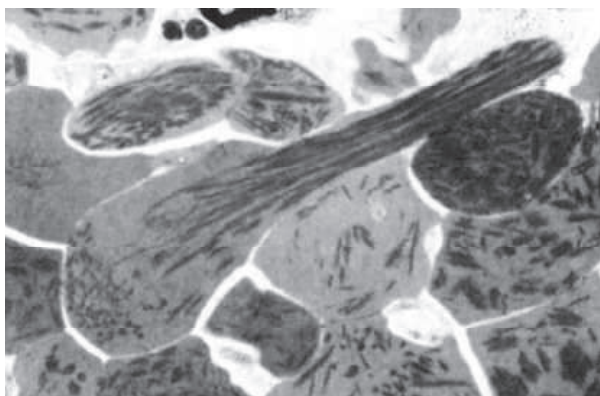
## I.3. MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA DREPANOCYTOSE

### I.3.i. LA FALCIFORMATION

La falciformation des GR est le mécanisme qui conduit à la modification morphologique des GR sous la contrainte des filaments de polymère d'HbS comme on peut le voir sur la photographie prise par Trudel et al. au microscope électronique (47) (figure 5). On y distingue clairement la présence de molécules organisées en filaments droits et parallèles (l'HbS polymérisée) qui modifient la forme du GR.

La falciformation est un processus actif et réversible influencé par l'état de poly/dépolymérisation qui évolue selon l'environnement physiologique.





**Figure 5 : Image prise au microscope électronique (X6000) d'un GR falciforme de souris SAD séquestré dans la rate.**

On peut observer les filaments de polymère d'Hb alignés parallèlement et modifiant la morphologie du GR. Image réalisée par Trudel et al. (47).

### ***1.3.i.a. ROLE DE L'OXYGENE, DU pH, DU 2,3 DPG ET DE LA TEMPERATURE DANS LA FALCIFORMATION DES GR***

La polymérisation s'initie lorsque l'HbS est sous sa forme désoxygénée de désoxyhémoglobine S, suite à une baisse de la pression partielle en O<sub>2</sub> (PO<sub>2</sub>) (29). Cette désoxygénation induit une modification structurale de l'HbS qui va dévoiler un acide aminé hydrophobe : la valine issue de la substitution  $\beta^S$ . Celle-ci va alors se lier automatiquement à d'autres acides aminés hydrophobes telles que l'alanine, la phénylalanine ou la leucine appartenant à une molécule d'HbS adjacente (48). Ainsi, de liaisons hydrophobiques en liaisons hydrophobiques, le polymère d'HbS se construit jusqu'à induire la falciformation des GR.

Comparée à l'HbA, l'HbS présente, à des faible PO<sub>2</sub>, une courbe de dissociation de l'Hb décalée vers la droite, ce qui signifie qu'en situation d'hypoxie, l'HbS désaturera plus que l'HbA (49-50).

D'autres éléments, comme l'acidose (baisse du pH intra ou extra-érythrocytaire) (51-52) ou une hausse de la température corporelle (53) induisent un glissement de la courbe de désaturation de l'Hb vers la droite. Ainsi, dans ces conditions, l'Hb aura tendance à désaturer plus et, dans le cas de l'HbS à polymériser plus qu'à pH neutre ou alcalin et qu'à température normale.

Enfin, les fortes concentrations en 2,3 DPG (2,3 diphosphoglycérate) retrouvées dans les GR SS comparés aux GR normaux (54), couplées aux baisse de pH induites par cette molécule, pourraient intervenir dans la baisse de l'affinité de l'HbS pour l'oxygène (55). Le 2,3 DPG est une molécule sécrétée durant la glycolyse et ses concentrations semblent augmenter dans les situations d'hypoxie, le but étant de faciliter le relargage d'oxygène dans

l'organisme en diminuant l'affinité de l'Hb pour celui-ci (54). Ce mécanisme s'avère toutefois contreproductif pour les sujets drépanocytaires car cela augmenterait les risques de polymérisation de l'HbS (56).

### **I.3.i.b. LA DESHYDRATATION ERYTHROCYTAIRE**

La déshydratation érythrocytaire est un des facteurs qui entrent en compte dans l'initiation de la polymérisation. Elle consiste en une fuite des liquides vers le compartiment extracellulaire, ce qui tend à augmenter la concentration intracellulaire en HbS et donc à diminuer le délai de polymérisation car les molécules d'HbS mettent moins de temps à rentrer en contact les unes avec les autres (57-60).

Cette déshydratation peut intervenir suite à plusieurs mécanismes combinés ou non :

- ❖ Une déshydratation de l'organisme qui s'accompagne d'une diminution du volume plasmatique, si bien que l'eau, qui va du compartiment contenant le plus d'eau à celui en contenant le moins, fuit à l'extérieur des GR (61).

- ❖ Une activation des canaux Gardos (« Gardos channel » en anglais) : il s'agit de canaux  $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$  (calcium/potassium), présents au niveau des membranes érythrocytaires et activés par une augmentation de calcium intracellulaire, dépendante de la désoxygénation de l'Hb (62-64). L'ouverture de ces canaux induit la fuite de potassium vers l'extérieur de la cellule (efflux de  $\text{K}^+$ ) (62), ce qui modifie les contenus ioniques intracellulaires et induit, par pression osmotique, des mouvements d'eau vers l'extérieur de la cellule (63). Cette activation des canaux Gardos pourrait aussi être induite par une fixation de l'endothéline-1 (un puissant vasoconstricteur) sur son récepteur l'ETB enchâssé dans la membrane érythrocytaire. La stimulation de l'ETB conduirait à l'activation des canaux  $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$  et favoriserait donc la déshydratation cellulaire (65-67).

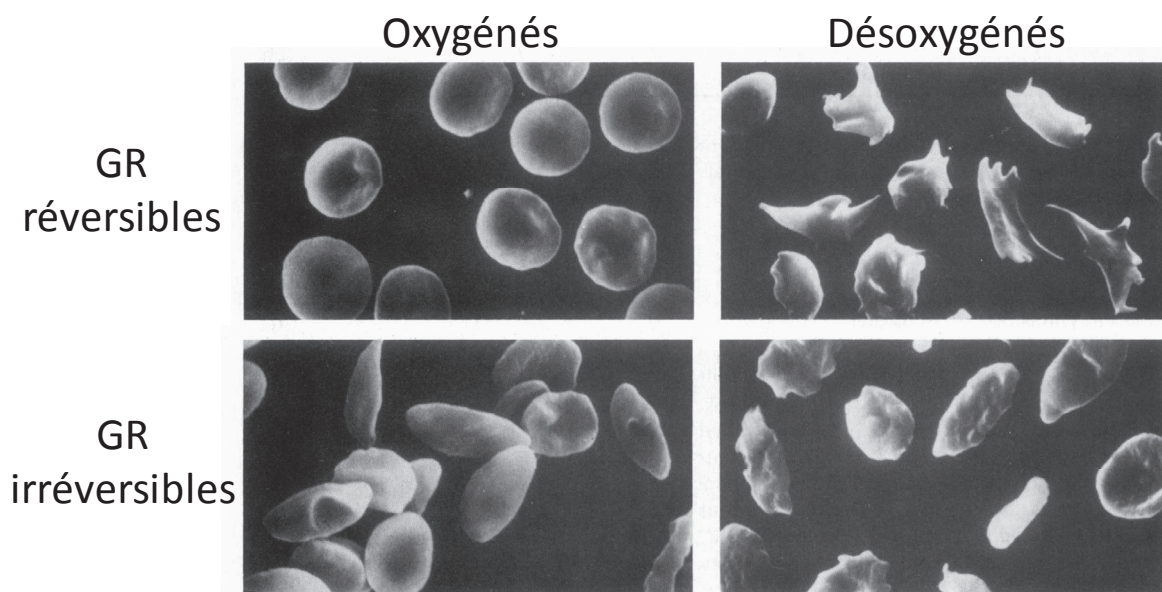
- ❖ Une activation des co-transporteurs  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  (potassium/chlore): l'activation des Gardos channel induit une acidification du pH, via les mouvements ioniques qu'ils occasionnent, ce qui active les co-transporteurs  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  (63), augmente l'efflux de potassium et donc la déshydratation cellulaire (57,62,68). Le stress oxydatif érythrocytaire, accru chez les sujets drépanocytaires (69-70), semble aussi intervenir dans l'activation de ce co-transporteur (71). Il agit soit directement en activant le canal  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ , soit indirectement en interagissant avec la cascade de régulation de ce transporteur : activation de  $\text{PP1}\alpha$  (protein

phosphatase  $1\alpha$  qui est un activateur du canal  $K^+/Cl^-$  ou inhibition des tyrosine kinases de la famille des Src (hck, frg) qui sont des inhibitrices de PP1 $\alpha$  (68).

### ***1.3.i.c. FORMATION DE CELLULES DENSES ET/OU IRREVERSIBLES ET DEFORMABILITE ERYTHROCYTAIRE***

La formation des cellules denses découle directement de la déshydratation cellulaire discutée ci-dessus (59,72). Ces cellules sont caractérisées par de fortes concentrations en Hb avec des valeurs de CCMH assez hautes (72). La formation de ces cellules est initialement réversible et étroitement liée à la polymérisation de l'Hb. Mais, suite à plusieurs processus d'oxygénation/désoxygénation, il arrive que la cellule reste bloquée à l'état de cellule dense ; c'est ce que l'on appelle les cellules denses irréversibles (ISC) : que l'Hb soit oxygénée ou désoxygénée, leur déformabilité est très faible (72-73). Ces cellules présentent de ce fait un faible pouvoir adhésif comparé aux GR falciformes qui pourrait s'expliquer par une membrane trop peu déformable qui ne permet pas de créer suffisamment de surface de contact avec l'endothélium pour y adhérer (60). En contrepartie, cette faible déformabilité pourrait intervenir de manière assez importante dans les vaso-occlusions car les cellules, beaucoup trop rigides, ne pourraient pas se déformer pour passer les zones présentant une grande concentration de GR SS déformables adhérents à l'endothélium (59,74-75).

Cette faible déformabilité sera démontrée par les résultats de Kaul et al. en 1983 qui observent de très faibles déformations des cellules denses irréversibles en situation de désoxygénation par rapport aux GR non denses sujets à la falciformation (73) (figure 6). Elle peut s'expliquer 1) par l'augmentation du CCMH, liée à la déshydratation cellulaire, qui va induire une augmentation de la viscosité intracellulaire (76) ainsi que 2) par une diminution de la flexibilité des membranes (72,77).



**Figure 6 : Image prise au microscope électronique de GR *in vitro* en condition d'oxygénation ou de désoxygénation.**

Les GR réversibles et irréversibles ont été séparés par un gradient de densité de Percoll-Renografin. On observe que la forme des GR irréversibles est peu influencée par le manque d'oxygène par rapport à celle des GR réversibles qui deviennent falciformes. Image obtenue d'après Kaul et al. (73)

### I.3.ii. L'HEMOLYSE

L'anémie hémolytique est un des symptômes caractéristiques de la drépanocytose qui se résume par d'importantes lyses des GR, qu'elles soient intravasculaires (1/3 de l'hémolyse) ou extravasculaires (2/3 de l'hémolyse) (78). Elle se traduit par des valeurs d'hématocrite assez basse chez les patients drépanocytaires (79). L'hémolyse est à la base un mécanisme physiologique normal d'apoptose des GR vieillissants (autour de 120j de vie) (80) et elle se trouve exacerbée chez les sujets drépanocytaires (60).

#### I.3.ii.a. L'HEMOLYSE EXTRAVASCULAIRE

L'hémolyse extravasculaire s'effectue par le système réticuloendothélial qui est constitué, entre autre, des cellules capables de phagocyter les cellules érythrocytaires sénescents. Dans le cadre de la drépanocytose, une forte erythro-phagocytose par les macrophages a été observée ainsi qu'une importante concentration, dans le foie, de cellules de Kupffer (cellule phagocytaire hépatique) chargées en GR (78,81). En effet, l'article d'Hebbel et Miller tend à montrer que les GR SS (GR des sujets drépanocytaires à HbSS) ont une capacité anormale à se faire phagocyter par les macrophages, avec *ex vivo*, une

moyenne de 19% d'ingestion pour les GR SS comparé à 3% pour les GR AA (GR des sujets sains à HbAA) (78). L'importance de ces destructions pourrait être expliquée par un taux anormalement élevé d'IgG, molécules reconnues par les macrophages, à la surface des GR SS (78). En parallèle, la forte quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ROS en anglais : « Reactive Oxygen Species ») générés dans les GR SS semblerait accélérer la phagocytose des cellules (69) ; une des explications à ce phénomène pourrait être la modification de l'asymétrie des phospholipides par le stress oxydatif qui conduit à une surexposition de la phosphatidylsérine (PS) à l'extérieur de la membrane des GR SS (82). Ces molécules sont alors reconnues par les macrophages qui disposent à leur surface des récepteurs spécifiques de la PS, ce qui aboutit à la phagocytose des GR SS (70,83).

### ***1.3.ii.b. L'HEMOLYSE INTRAVASCULAIRE***

Les patients drépanocytaires présentent de même une importante hémolyse intravasculaire ; celle-ci pourrait être mise sur le compte du stress-oxydatif, qui est plus important dans les GR SS que GR AA (82). En effet, l'auto-oxydation des GR falciformes est plus importante que celle des GR normaux et pourrait être associée à une augmentation du fer libre intra-érythrocytaire (84) qui est un inducteur, entre autre, de peroxydations lipidiques. Cela augmente l'instabilité de la bicouche lipidique et donc le risque de lésions membranaires (70,85).

Cette dernière forme d'hémolyse est la plus destructrice pour les sujets drépanocytaires car elle entraîne le relargage, dans la circulation systémique, d'Hb libre ayant un fort pouvoir oxydatif (86), une grande capacité à neutraliser le NO (oxyde nitrique) (86), ainsi qu'une capacité accrue à activer l'endothélium vasculaire (70). En réponse à cette augmentation d'Hb libre, des mécanismes de neutralisation de ces molécules se mettent en place (86) : l'Hb libre est piégée par l'haptoglobine et l'hème libre est neutralisé par l'hémopexine ; ces molécules vont ainsi diriger l'Hb et l'hème vers des compartiments de phagocytose ou d'endocytose (86-87). Mais il se peut que dans le cadre de la drépanocytose, ces défenses soient submergées et donc insuffisantes pour contenir tout l'Hb libre (86).

Que l'hémolyse soit intravasculaire ou extravasculaire, elle va induire une diminution de la quantité de GR dans le sang et donc activer les mécanismes d'érythropoïèse visant à réinjecter de nouveaux GR dans la circulation (59). Cela expliquerait pourquoi les taux de réticulocytes, jeunes GR immatures, sont assez élevés chez les sujets drépanocytaires. A noter que cette augmentation de réticulocytes n'est pas favorable à ces patients car ces cellules présentent un fort pouvoir adhésif (59), ce qui augmente la quantité de cellules pouvant être impliquées dans les occlusions vasculaires.

### **I.3.iii. LES CRISES VASO-OCCLUSIVES**

L'occlusion vasculaire est un processus initié par la falciformation des GR auquel vient s'ajouter l'intervention de multiples facteurs tels que les modifications hémorhéologiques, l'inflammation, l'adhésion vasculaire, le stress oxydatif, l'hémolyse ou encore la coagulation sanguine. Ces mécanismes vont s'amplifier dans le temps selon un cercle vicieux qui va conduire à la genèse d'occlusions vasculaires, symptômes majeurs de la drépanocytose.

#### ***I.3.iii.a. LES MODIFICATIONS DES PARAMETRES HEMORHEOLOGIQUES, UN FACTEUR IMPORTANT DANS LA GENESE DES CVO***

L'hémorhéologie est un domaine de recherche qui étudie les facteurs qui peuvent affecter la résistance au flux sanguin. Parmi ces facteurs, on peut noter la déformabilité et l'agrégabilité des GR, l'agrégabilité plaquettaire ainsi que la déformabilité et l'adhésion des GB à l'endothélium (77,88).

Les sujets drépanocytaires sont caractérisés par des modifications de divers paramètres hémorhéologiques (79) :

- une diminution de la déformabilité érythrocytaire, ce qui va compliquer le passage des GR dans les capillaires sanguins ;
- une augmentation de la vitesse de cisaillement minimale nécessaire pour désagréger un agrégat érythrocytaire et, en parallèle, une augmentation de l'agrégation érythrocytaire;
- une diminution du rapport hématocrite/viscosité sanguine, un indicateur de l'efficacité du transport de l'oxygène dans le sang chez les sujets drépanocytaires.

Deux types de comportement hémorhéologique se distinguent dans l'arbre vasculaire : celui des gros vaisseaux tels que les artères et celui des petits vaisseaux que sont les capillaires et dans une moindre mesure les veinules postcapillaires :

❖ Hémorhéologie dans les gros vaisseaux : Lorsque les vaisseaux ne présentent pas de bifurcation ou de virage, le flux sanguin est plutôt unidirectionnel ou laminaire et les mécanismes de vasodilatation/constriction permettent de maintenir des contraintes de cisaillement relativement stables (entre 10 et 30 dynes/cm<sup>2</sup>). Ainsi, chez les sujets drépanocytaires, les complications qui peuvent opérer dans ces zones sont le plus souvent la conséquence d'une mauvaise modulation du tonus vasculaire par l'endothélium (cf. partie2.IV ; p70) (60).

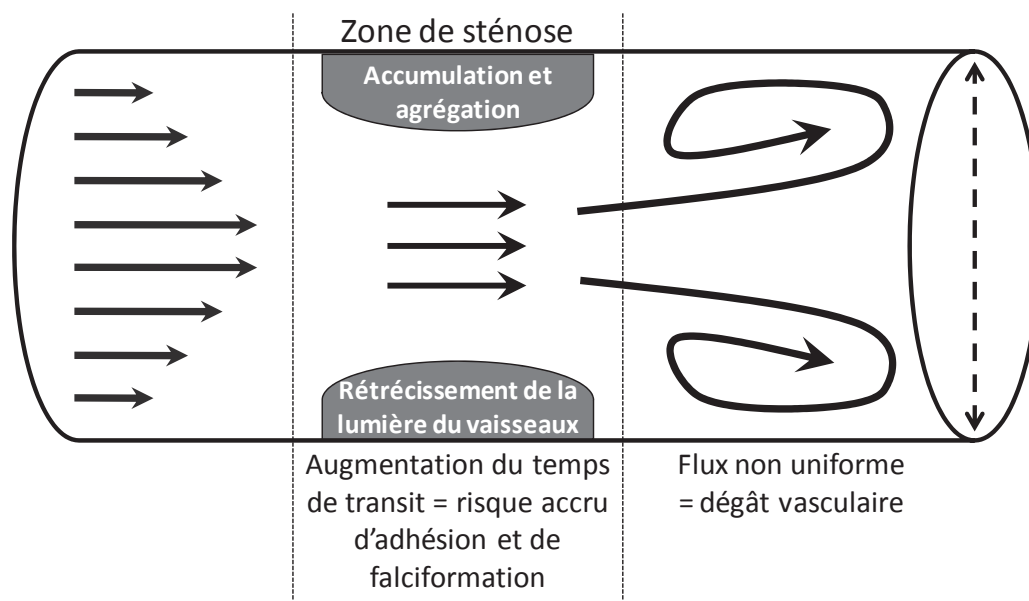
En parallèle, au niveau des bifurcations de l'arbre artériel, comme c'est le cas au niveau de la crosse aortique, les contraintes de cisaillement ne sont pas uniformes et sont oscillantes. Ces zones sont problématiques dans de multiples pathologies car s'y produisent de fortes variations de pression causées par l'augmentation des contraintes de cisaillement (89). Ces contraintes de cisaillement importantes se trouvent impliquées dans les problèmes de développement de plaque qui causent une augmentation des ROS, de l'épaisseur de l'intima, un remodelage du mur vasculaire et des rétrécissements de la lumière des vaisseaux sanguins qui peuvent conduire à des pathologies cardiovasculaires (60). Il a en outre été observé *ex vivo* que ces zones de flux non uniforme induisaient une augmentation de la stimulation de NFκB (Nuclear factor kappa B), un facteur de transcription impliqué dans l'activation endothéliale et l'expression de molécules d'adhérence vasculaire (89). Il en découle une forte augmentation de l'adhésion monocytaire (89-90). Ainsi, chez les sujets drépanocytaires, il semblerait que les zones de bifurcation apparaissent comme des zones à risques. Aux effets des contraintes de cisaillement oscillantes vont s'ajouter :

- l'hémolyse, génératrice de radicaux libres via l'Hb libre,
- la présence de GR à fort potentiel adhésif,
- la présence de GR denses pouvant augmenter la viscosité sanguine (77) et se bloquer dans les zones de faible diamètre.

Enfin, les zones d'agrégation et d'accumulation cellulaire dans les gros vaisseaux vont induire des zones de sténose avec augmentation du temps de transit des GR. Cela va donc



augmenter le risque d'adhésion et de falciformation des GR mais aussi créer, à la sortie de cette zone, une zone du flux sanguin turbulent/non uniforme qui se trouve associée comme décrit ci-dessus, à une forte modification vasculaire délétère pour les drépanocytaires (figure 7). Il a, en effet, été observé, par doppler trans-crânien, qu'un flux sanguin élevé, caractéristique de ces zones de sténose/vasoconstriction, était associée à un risque accru d'accident vasculaire cérébral (91).



**Figure 7 : Comportement du flux sanguin dans un gros vaisseau lors d'un phénomène de sténose.** Le flux parabolique présent dans la zone pré-sténose et diminué au niveau de la zone de stase causée, chez les drépanocytaires par une accumulation de cellules adhérentes. A la sortie de cette zone, le flux devient turbulent, non uniforme, ce qui cause des dégâts endothéliaux tels que l'activation endothéliale ou la génération de ROS. Schéma traduit de Barabino et al. (60).

❖ Hémorhéologie dans les capillaires et veinules postcapillaires : Les capillaires et veinules postcapillaires (VPC) font partie des principaux sites d'occlusions vasculaires observés chez les patients drépanocytaires (92) et cela n'est pas indépendant du comportement hémorhéologique à cet endroit. En effet, les capillaires, de par leur fonction qui est de permettre l'oxygénation tissulaire, présentent la caractéristique d'être traversés par un flux sanguin limité associé à de faibles contraintes de cisaillement pour laisser du temps à la diffusion de l'oxygène (60). Les VPC, qui sont les vaisseaux dans lesquels se jettent les capillaires, reçoivent le sang désoxygéné et présentent pour un diamètre identique, des contraintes et des vitesses de cisaillements inférieures aux capillaires (88). Ainsi, ces faibles vitesses de cisaillement, associées à une importante viscosité sanguine (77), semblent assez



délétères aux drépanocytaires car cela pourrait augmenter le temps de transit des GR (77) ainsi que leur agrégation (60).

En effet, la désoxygénation des GR au niveau des capillaires favorise la polymérisation de l'Hb et donc la falciformation. Mais ce mécanisme n'est pas immédiat, et nécessite un temps de latence (59). C'est pour cela qu'une augmentation du temps de transit augmente le délai permettant à l'Hb de polymériser et donc augmente le nombre de drépanocytes moins déformables. Cela initie le cercle vicieux de la drépanocytose où la polymérisation, causée par une viscosité importante, amplifie cette viscosité et donc la polymérisation, ce qui conduit peu à peu au blocage des vaisseaux par des drépanocytes moins déformables et à l'occlusion vasculaire (60). Beaucoup d'autres facteurs interviennent dans ce mécanisme vaso-occlusif drépanocytaire. Ils seront discutés dans les prochains chapitres.

### **1.3.iii.b. LE CERCLE VICIEUX DE LA DREPANOCYTOSE**

Les mécanismes impliqués dans les occlusions vasculaires chez le sujet drépanocytaire s'auto-entretiennent et forment ce que l'on peut appeler un cercle vicieux. Le cercle vicieux de la drépanocytose débute avec la désoxygénation de l'hémoglobine qui, suite à l'intervention de divers facteurs, s'amplifie avec le temps jusqu'à arriver à un point de non-retour aboutissant à la crise vaso-occlusive : le vaisseau sanguin est très fortement obstrué et l'oxygénation des organes en amont se trouve altérée (86).

L'élément déclencheur de ce cercle vicieux est souvent le phénomène d'hypoxie, qui va induire la falciformation des GR ainsi que la production de ROS (70,93). Cette falciformation induit une augmentation de l'hémolyse, elle aussi impliquée dans la production de ROS (86).

Il s'ensuit alors la mise en place d'une réponse inflammatoire, caractérisée notamment par l'activation de l'endothélium vasculaire qui va alors produire diverses molécules dont des molécules d'adhérence vasculaire (qui lient les GR et globules blancs - GB - à l'endothélium), certains modulateurs du tonus vasculaire tels que l'endothéline-1 (ET-1, puissant vasoconstricteur) ou encore des molécules impliquées dans la cascade de coagulation (TF : facteur tissulaire) (93). Cette réponse inflammatoire conduit à la diminution de la lumière des vaisseaux sanguins et donc au blocage des GR denses, trop peu déformables pour traverser ces amas cellulaires (59) ainsi qu'à une augmentation de

l'hypoxie locale. Cette hypoxie locale favorise encore plus la falciformation, et toutes les réactions en chaîne précédemment décrites : le cercle vicieux est bouclé et peut conduire à la crise vaso-occlusive (figure 8).

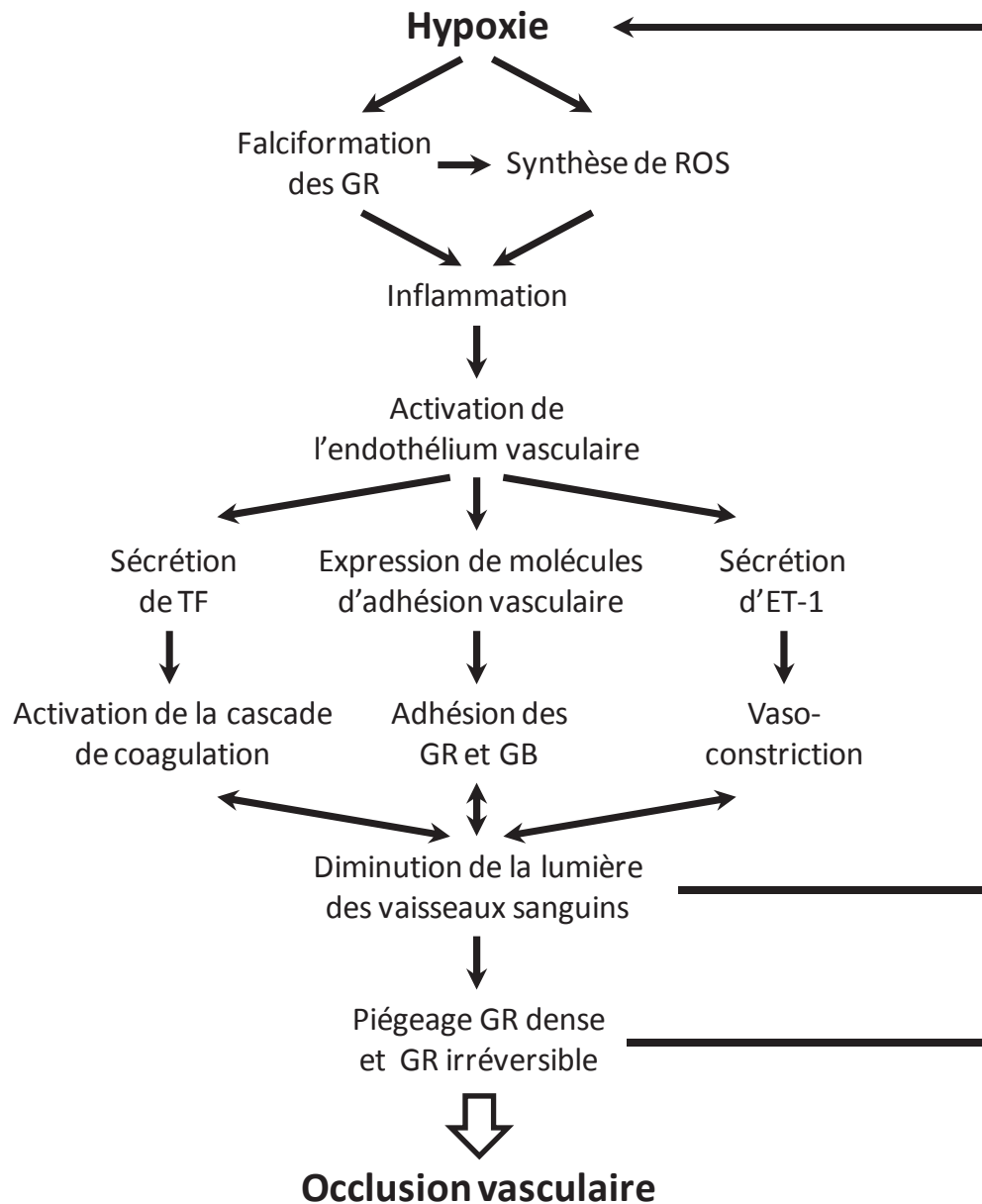


Figure 8 : Modélisation générale de la crise vaso-occlusive et des principaux facteurs impliqués dans cette symptomatique.

#### 1.4. ASPECTS CLINIQUES DE LA DREPANOCYTOSE

Comme nous avons pu le voir dans les précédents chapitres, la crise vaso-occlusive est la symptomatique majeure des patients drépanocytaires (94) et elle peut être très

problématique en fonction de l'intensité et du lieu où elle se manifeste. Elle conduit, de plus, à l'expression d'un grand panel de symptômes qui vont être décrits dans ce chapitre.

L'expression clinique de cette pathologie est très diversifiée puisqu'elle peut varier de patients fréquemment admis en service hospitalier pour des traitements de complications aiguës, à des patients ayant très rarement besoin d'un environnement médicalisé (95). En effet, d'après l'étude de Platt et al, il a été montré que sur une population de 3518 drépanocytaires homozygotes analysés pendant 5 à 6 ans, 5,2% de la population étudiée présentaient plus de 3 crises douloureuses par an, 40% avaient moins de 1 crise par an et 39% n'avaient pas d'épisode nécessitant d'hospitalisation (96). Il faut savoir que la fréquence des crises douloureuses est un des paramètres importants pour évaluer la survie de l'individu à long terme et que plus de 3 crises par an peuvent être un indicateur de sévérité de la maladie et un facteur de risque de mort précoce (94).

La symptomatique des drépanocytaires présente la particularité de pouvoir être classifiée selon des catégories d'âge :

- ❖ les enfants en très bas âge, de 6 mois (lorsque l'HbF commence à disparaître) jusqu'à 5 ans (97-98): cette classe d'âge présente le plus souvent des risques de séquestration splénique avec splénomégalie qui sont parfois la conséquence d'infections bactérienne et qui peuvent entraîner d'importantes anémies hémolytiques et parfois altérer la survie de l'individu (98-99). De plus, les enfants en bas âge sont très sensibles aux infections du type méningite, septicémie, ostéomyélite, infection urinaire qui s'expriment très fortement et peuvent leur être fatales (100).

- ❖ les enfants et jeunes adultes : de 5 à 20 ans : c'est dans cette tranche d'âge que les personnes atteintes de drépanocytose sont le plus sujettes aux crises vaso-occlusives avec, entre autre, des risques d'AVC accrus (91,101) et parfois de fréquents épisodes de crises douloureuses nécessitant l'hospitalisation. Ils sont de plus très sensibles aux infections, essentiellement par des micro-organismes encapsulés (70).

- ❖ les adultes après 20 ans : les crises vaso-occlusives se font plus rares mais ces personnes ont alors à faire aux conséquences des crises qu'elles ont subies précédemment (94) qui vont conduire à diverses pathologies organiques chroniques telles que l'insuffisance rénale, l'hypertension artérielle pulmonaire, la rétinopathie, le syndrome thoracique aigu, les ulcères aux jambes, le priapisme ou encore l'AVC (18,95).

De ce tableau, une évolution a été présentée en 2007 par Kato, Gladwin et Steinberg (18), qui font ressortir deux sous-groupes dans les manifestations cliniques de la drépanocytose :

❖ le premier, qui concernerait des personnes atteintes d'un syndrome qu'ils nomment « hémolyse et dysfonction endothéliale » et qui se caractériserait par une diminution de la biodisponibilité du NO, entraînant ainsi un haut niveau de lactate déshydrogénase (LDH) plasmatique, de l'hypertension artérielle pulmonaire, des ulcères aux jambes et du priapisme.

❖ un autre sous-groupe, nommé « viscosité et vaso-occlusion » se caractériserait plutôt par des personnes atteintes des crises douloureuses vaso-occlusives, des syndromes thoraciques aigus et d'ostéonécrose.

#### I.5. LES TRAITEMENTS DE LA DREPANOCYTOSE

A l'heure actuelle, il n'existe aucun médicament capable de guérir définitivement de la drépanocytose. Mais, en 1995 a été adopté le premier médicament capable de fortement réduire la morbidité et la mortalité de la pathologie : l'hydroxyurée (102). Le principe actif, en augmentant les concentrations d'HbF (103) permet de réduire significativement les épisodes de crises douloureuses chez les drépanocytaires (37). Il semblerait, avec le recul, que l'hydroxyurée ait grandement contribué à améliorer l'espérance de vie des drépanocytaires (102).

A cela s'ajoutent les transfusions sanguines, fréquemment utilisées afin de réduire rapidement la concentration sanguine en HbS aux environs de 30% (104). Elles sont préférentiellement utilisées suite à des événements d'anémie hémolytique sévère, de séquestration hépatique et splénique et parfois lors d'un syndrome thoracique aigu ou d'un AVC (104-105). Ces transfusions sont aussi utilisées de façon préventive chez les enfants présentant de forts risques d'AVC, et chez les patients chez qui l'hydroxyurée manque d'efficacité. L'utilisation de cette technique comporte toutefois des effets délétères puisqu'elle peut provoquer des allo-immunisations ainsi qu'une accumulation de fer dans les organes vitaux ce qui implique l'utilisation conjointe d'un chélateur de fer afin d'en diminuer les fortes concentrations, délétères pour l'organisme (104,106).

Enfin, la transplantation de moelle osseuse est parfois utilisée pour des patients assez jeunes et présentant une forme très sévère de la maladie ainsi que la disponibilité d'un donneur de moelle osseuse compatible. Il n'en reste pas moins que ce traitement dispose encore de très peu de recul ainsi qu'une mortalité de 10% sur le court terme et des risques de complications neurologiques (104,107).

Du point de vue des traitements expérimentaux, plusieurs études relatent l'utilisation positive de molécules inhibant la déshydratation des GR et donc la falciformation cellulaire. De Franceschi et al. ont beaucoup contribué à ce domaine avec le test de diverses molécules inhibitrices des canaux Gardos (108) tels le clotrizamole (62) ou encore inhibitrice des co-transporteur  $K^+/Cl^-$  (63) avec la supplémentation en magnésium (57,62). Enfin, un autre traitement expérimental est en cours d'étude. Il s'agit de tester un antagoniste à l'endothéline-1, le Bosentan, déjà disponible sur le marché et utilisé dans l'hypertension artérielle pulmonaire (109).

## II. LE TRAIT DREPANOCYTAIRE

Le trait drépanocytaire, qui caractérise les personnes porteuses de la mutation  $\beta^S$  à l'état hétérozygote (HbAS), est un état généralement identifié comme asymptomatique par la communauté médicale dans le sens où il n'affecte pas la morbidité et la mortalité de l'individu (110). Ce consensus est toutefois discuté au regard des publications relatant des cas de mort subite, de symptômes cliniques ou d'anormalités sanguines pouvant être reliés à la présence du trait drépanocytaire (110-114). Certains auteurs vont même jusqu'à proposer de classifier le trait drépanocytaire comme une pathologie à part entière (115).

D'un point de vue biologique, les PTD semblent présenter au repos une augmentation de l'hématocrite optimale, ce qui signifie que pour délivrer une quantité optimale d'oxygène, l'hématocrite doit être plus élevée chez les PTD comparé aux sujets HbAA (116). Ils sont aussi caractérisés par une diminution de la déformabilité érythrocytaire (117-118), une augmentation de la viscosité sanguine (119), une hypercoagulabilité (120), des concentrations plasmatiques plus élevées en molécules solubles d'adhérence vasculaire : sVCAM-1 (121-122), L et P-sélectines (123). De plus, les sujets PTD présentent au niveau musculaire (muscle vaste latéral) une réduction de la proportion des capillaires de faible diamètre, une augmentation de ceux à large diamètre et une diminution de la tortuosité des

micro-vaisseaux suggérant un remodelage vasculaire pour faire front aux modifications hémorhéologiques survenant chez les PTD (124).

Il semblerait donc que les PTD présentent, pour certains paramètres, un statut intermédiaire entre les sujets HbAA et HbSS et que suite à certaines conditions tels que l'exercice aigu cela puisse conduire à des altérations organiques pouvant mener à la mort subite du sujet (cf. partie 4.II.1 ; p118) (125).

### III. MODELES DE SOURIS TRANSGENIQUES DREPANOCYTAIRES

#### III.1. SOURIS SAD

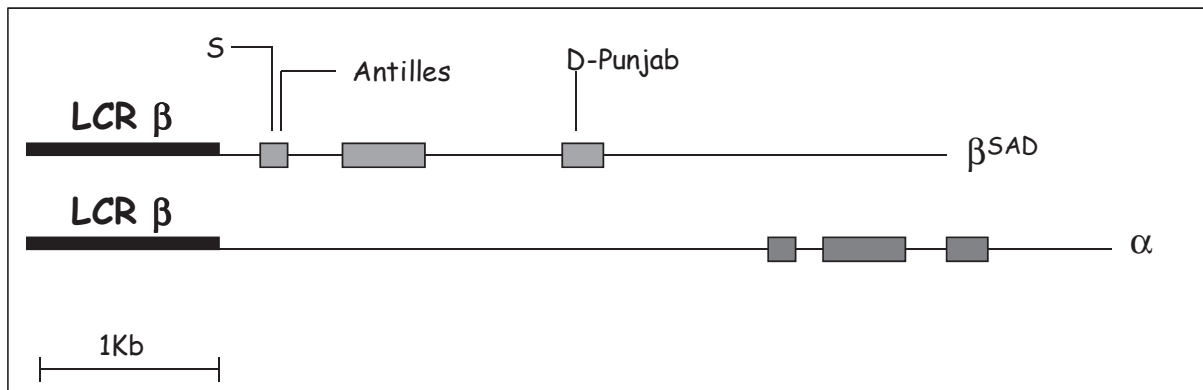
##### III.1.i. PRESENTATION DU MODELE ANIMAL

La souris SAD est un modèle murin de la drépanocytose développé par l'équipe du Dr Trudel (Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Canada) et du Dr Beuzard (Hôpital Henri-Mondor, Créteil, France) en 1990 (126). La mise en place de cette souche de souris a constitué en une insertion, dans une lignée de cellules germinales issues de C57Bl/6, d'un transgène codant pour l' $\alpha$  globine humaine et la  $\beta^{SAD}$  globine, synthétisée artificiellement (figure 9). Ce transgène  $\beta^{SAD}$  est issu du gène de la  $\beta^S$  globine humaine (Hb muté drépanocytaire : substitution  $\beta^6Val$ ) auxquels deux autres mutations impliquées dans la drépanocytose ont été insérées : la mutation  $\beta^{Antilles}$  (substitution  $\beta^{23Ile}$ ) et la mutation  $\beta^{D-Punjab}$  (substitution  $\beta^{121Gln}$ ) (127).

La mutation  $\beta^{Antilles}$  couplé à la mutation  $\beta^S$  permet d'augmenter la sévérité clinique de l'Hb S en diminuant l'affinité de l'Hb S-Antilles pour l'oxygène et en augmentant le nombre de sites impliqués dans la polymérisation de l'Hb. En parallèle la mutation  $\beta^{D-Punjab}$  a pour conséquence de diminuer la solubilité de l'Hb S /Hb D-punjab désoxygénée, ce qui induit une stabilisation des polymères d'Hb et donc une amplification des symptômes drépanocytaires (127).

L'insertion de ce transgène induit l'expression d'environ 19% d'Hb SAD chez les souris SAD, ce qui est assez peu par comparaison aux 95% d'HbS des patients drépanocytaires SS (13). Cependant, l'hémoglobine SAD ayant une très faible solubilité en situation désoxygénée, elle présente un temps de polymérisation très rapide comparé à celui de

l'HbS (127). Il a ainsi été observé, suite à une désoxygénation, la présence de GR falciformes, de forme et de longueur de polymères identiques à celles de l'Homme (127).



**Figure 9 : Schéma des constructions des gènes  $\beta^{SAD}$  et  $\alpha$  globine humaine utilisée pour la mise au point de la souris transgénique SAD.**

Pour obtenir des souris SAD, il y a eu insertion chez la souris C57Bl6 des gènes de la  $\beta$  globine et de l' $\alpha$  globine humaine, auxquels un LCR de la  $\beta$  globine humaine est ajouté. Le gène de la  $\beta$  globine comporte trois mutations présentes chez les patients drépanocytaires : les mutations  $\beta_s$ , S-Antilles et D-Punjab qui, toutes trois cumulées, amplifient les symptômes de la drépanocytose et permettent de faire de la souris SAD un bon modèle d'étude. D'après Trudel et al. (127).

### III.1.ii. MANIFESTATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA DREPANOCYTOSE HUMAINE CHEZ LES SOURIS SAD

#### III.1.ii.a. L'ESPERANCE DE VIE

Bien que l'espérance de vie des patients drépanocytaires ait considérablement augmenté ces dernières années grâce aux progrès médicaux et à une meilleure prise en charge des patients, celle-ci reste tout de même en deçà d'une personne saine. La même constatation a été faite chez les souris SAD qui présentent une espérance de vie d'environ 15 mois comparé au 23-28 mois des souris contrôles (respectivement C57Bl/6 et CBA/J) (47). De plus, les élevages de souris SAD présentent un taux de mortalité fœtale et néonatale assez important puisque au lieu des 50% de souris SAD attendues (croisement entre un mâle hétérozygote SAD et une femelle saine), seulement 18-32% des nouveaux nés sont identifiés comme porteur du transgène  $\beta^{SAD}$  (6). L'explication pourrait être l'absence d'HbF chez les fœtus murin, ce qui entraîne la présence d'HbS chez les fœtus SAD. Il en résulte une forte

anémie, des retards de croissance et un accroissement de la mortalité fœtale et néonatale (127).

### III.1.ii.b. *LES OCCLUSIONS VASCULAIRES*

La souris SAD est un modèle de souris transgéniques présentant une assez faible expression de la physiopathologie de la drépanocytose en situation basale mais qui offre l'avantage de présenter des événements vaso-occlusifs aigus en réponse à un stress d'hypoxie/réoxygénation (H/R) (47,108-109,128). Les principaux organes touchés par ces occlusions vasculaires sont les poumons et les reins (47). Il semblerait, en effet, que les souris SAD soient un bon modèle pour l'étude des glomérulopathies/néphropathies qui peuvent apparaître chez les sujets drépanocytaires : ces problèmes rénaux sont présents chez 45% des souris de plus de 43 semaines sous la forme de glomerulosclérose<sup>2</sup> modérée voire sévère pour 29% des souris de plus de 73 semaines (129). De plus, des modifications du flux sanguin rénal, suggérant des occlusions vasculaires partielles, sont observées par échographie doppler en réponse à un stress d'H/R (109,130).

### III.1.ii.c. *LA DESHYDRATATION DES GR ET LA FORMATION DE CELLULES DENSES*

Cet aspect physiopathologique de la souris SAD a beaucoup été étudié, notamment par l'équipe du Pr De Franceschi (57,62-63,68,108,131) car la souris SAD présente des mécanismes de déshydratation des GR proches de ceux observés chez l'Homme (intervention des canaux Gardos et co-transporteur  $K^+/Cl^-$ ). Plusieurs études ont utilisé ce modèle pour mieux comprendre les mécanismes de la déshydratation cellulaire (57,67-68,71,131) ou bien pour tester des molécules inhibitrices de ces canaux ioniques (62-63,108).

### III.1.ii.d. *LES MODIFICATIONS DU TONUS VASCULAIRE*

Le tonus vasculaire joue un rôle important dans la genèse des crises vaso-occlusives. En effet, une expression exacerbée d'ET-1 et/ou une baisse de la biodisponibilité du NO aboutissent à des situations de vasoconstriction, limitant ainsi la lumière des vaisseaux

---

<sup>2</sup> Glomérulosclérose : défaillance des glomérules causée par des lésions qui peuvent conduire à leurs destructions



sanguins, le débit sanguin, et favorisant la CVO. Cette régulation anormale du métabolisme du NO a aussi été décrite chez la souris SAD qui, suite à un choc septique, présente une diminution de la biodisponibilité du NO, ce qui peut favoriser les événements vaso-occlusifs (132). De plus, il a été montré chez ces souris que l'inhalation de NO pouvait améliorer la survie des souris SAD (133) ainsi que limiter certains paramètres inflammatoires impliqués dans la genèse des crises vaso-occlusives (134).

### **III.2. SOURIS BERK**

#### **III.2.i. PRESENTATION DU MODELE ANIMAL**

La souris BERK est un modèle murin exprimant exclusivement de l'hémoglobine S humaine et présentant conjointement, un phénotype  $\beta$  thalassémique modéré qui lui permet une survie de plusieurs mois (135). La mise en place du modèle a constitué en l'invalidation de tous les gènes codant pour l'hémoglobine murine, soit la globine  $\alpha$  et  $\beta$  murine, puis à l'insertion d'un transgène. Celui-ci code pour l'hémoglobine S humaine et comprend les globines  $\alpha$  et  $\beta^S$  et la globine  $\gamma$  qui est exprimée seulement durant la vie fœtale afin de permettre la production d'HbF ( $\alpha 2\gamma 2$ ) et de diminuer les morts prénatales (5). Plus précisément, les souris ont un fond génétique multiple : 129 \* Black Swiss \* C57BL/6 \* DBA/2 \* FVB/N avec deux knock-out (KO) pour l'hémoglobine murine:  $Hba^0//Hba^0$  et  $Hbb^0//Hbb^0$  et l'insertion d'un transgène permettant la synthèse d'HbS: Tg (Hu-miniLCR $\alpha 1^G\gamma^A\delta\beta^S$ ) (5). Certaines études utilisent aussi le modèle hBERK, qui sont des souris hétérozygotes pour le KO sur l'Hbb murine et qui présentent une forme pathologique intermédiaire entre les BERK et les souris contrôles ; leurs génotypes est :  $Hba^0//Hba^0$ ;  $Hbb^0//+$  ; Tg (Hu-miniLCR $\alpha 1^G\gamma^A\delta\beta^S$ ).

#### **III.2.ii. MANIFESTATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA DREPANOCYTOSE HUMAINE CHEZ LES SOURIS BERK**

La présence de pratiquement 100% d'HbS chez les souris BERK leur confère, sur certaines symptomatiques, un phénotype particulièrement proche de la drépanocytose humaine. L'aspect le plus caractéristique de la pathologie que sont les GR falciformes a été observés chez les BERK ainsi que la présence de GR denses et irréversibles. Ces souris présentent une l'hémolyse intravasculaire et sont donc anémiées avec un hémocrite très

bas ( $28,7 \pm 2,5\%$  pour les BERK comparé à  $43,6 \pm 1,2\%$  pour des souris contrôles), une réticulocytose très importante et une leucocytose. Il en découle une cardiomégalie causée par l'augmentation de la fréquence cardiaque qui vient contrebalancer l'anémie, des dommages multiples aux organes tels que les reins (glomérulosclérose, fibrose, atrophie...), le poumon (congestion vasculaire), le foie (infarctus ischémique) et la rate (congestion) ; des congestions viscérales, et des dilatations irrégulières des microvaisseaux cérébraux ; un dépôt de fer important dans le poumon, le foie, la rate et les reins ont par ailleurs été observés (5,135).

Sur certains autres aspects, on peut noter un comportement de la souris BERK différent de celui des patients drépanocytaires avec, par exemple, des valeurs de CCMH normales ou plus basses que la moyenne. L'inverse est observé chez les patients drépanocytaires et cela pourrait s'expliquer par la présence du phénotype modéré  $\beta$ -thalassémique. Des splénomégalies très importantes ont aussi été rapportées chez ce modèle de souris, dont l'origine pourrait être la forte hématopoïèse (qui s'effectue dans la rate chez les souris contrairement à l'homme ou elle se fait dans la moelle osseuse). De plus, ces souris présentent des infarctus hépatiques plus importants ainsi que des manifestations pulmonaires moindres et une absence d'hyperplasie vasculaire (135).

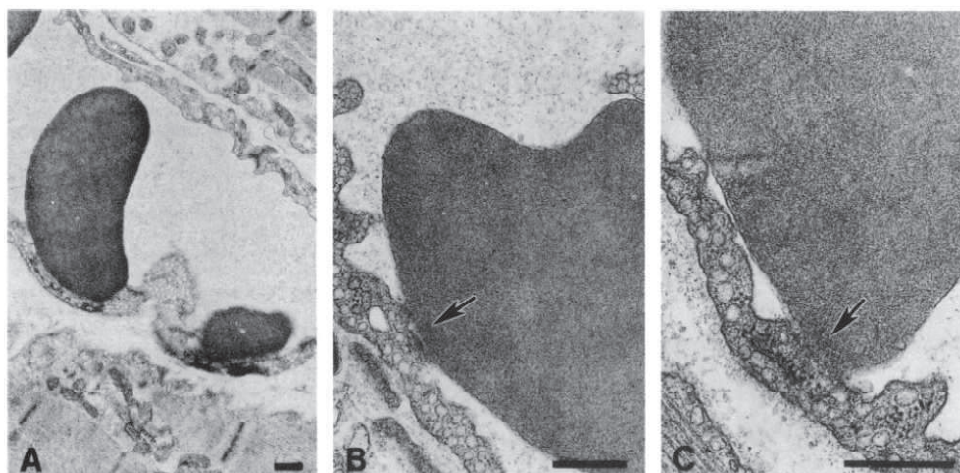
Enfin, malgré la présence d'HbF chez les nouveau-nés BERK, celle-ci est en concentration bien inférieure comparée à celle des nouveau-nés humains. Cela cause une assez forte mortalité néo-natale chez les souriceaux BERK faute de protections contre les effets délétères de l'HbS (5).

### III.3. AUTRES MODELES DE SOURIS TRANSGENIQUES DREPANOCYTAIRES

❖ Les NY1DD ou anciennement  $\alpha^H\beta^S\beta^{MDD}$  : développées par Fabry et al. en 1992 (136), elles ont été créées par insertion de 2 transgènes chez des souris FVB/N: un portant la globine  $\alpha$  humaine ( $\alpha^H$ ) et l'autre portant la globine humaine  $\beta^S$ . Ces souris présentent de plus une délétion homozygote de l'Hb  $\beta^{major}$  murine ( $\beta^{MDD}$ ; MDD pour « mouse deletion ») par croisement avec des souris C57Bl/6 ayant la délétion en globine  $\beta^{major}$  murine (136-137). Ces souris expriment un peu plus de 70% de globine  $\beta^S$  et 40% d'HbS ( $\alpha^H\beta^S$ )<sub>2</sub> et elles développent un phénotype inflammatoire après H/R se traduisant par des peroxydations lipidiques, le recrutement/adhésion des leucocytes à

l'endothélium (138-140) ainsi qu'une expression accrue de TF impliqué dans l'activation de la cascade de coagulation (141) et une augmentation des cellules denses (142). Des baisses de la biodisponibilité du NO et des défenses antioxydantes ont aussi été observées chez ces souris, pouvant être contrebalancées par une supplémentation en arginine (140). Elles présentent en revanche des valeurs de CCMH, concentration en Hb et hématocrite proche de celles de leurs contrôles C57Bl/6 (136).

❖ Les souris (S+S-Antilles) : développées par Fabry et al., elles consistent en un croisement entre des souris NY1DD et des souris  $\alpha^H\beta^{S\text{-Antilles}}$ , ce qui conduit à des souris exprimant les mutations  $\beta^{S\text{-Antilles}}$  et qui présentent, comme on a pu le voir chez les SAD, une baisse de l'affinité pour l'oxygène ainsi qu'une diminution de la solubilité de l'Hb (143). Elles présentent en outre une plus grande quantité de GR denses ainsi qu'une plus grande sévérité comparé aux souris NY1DD (141,143). Ces souris ne sont pas anémiques mais présentent une hémolyse qui est compensée par une réticulocytose. Des séquestrations de GR dans le poumon et le foie avec inflammation et des infarctus localisés ont aussi été observés chez ces souris (144). Des anomalies du tonus vasculaire, avec une diminution de la relaxation des vaisseaux, ont aussi été décrites et pourraient être causées par des peroxydations lipidiques accrues venant diminuer la biodisponibilité du NO (145). De plus, ce sont les premières souris expérimentées par Kaul et al. pour observer *in vivo* les adhésions des GR à l'endothélium et, grâce aux techniques de microscopie électronique, les points de contact entre les GR et l'endothélium ont pu être décrits (figure 10) (146).



**Figure 10 : Image de microscopie électronique de transmission permettant d'observer les interactions endothélium veinulaire/GR dans le muscle crémaster et leurs points de contacts.**

La barre représente 0,5 $\mu$ m et les images présentent des grossissements croissant de A à C. Image d'après Kaul et al. (146)

⇒ Pour conclure sur les modèles de souris transgéniques drépanocytaires fréquemment utilisés, les BERK semblent être le modèle le plus sévère avec la survenue d'importants dommages organiques. Puis par ordre de sévérité décroissante, les souris S+S-Antilles semblent devancer les autres modèles car elles présentent des anomalies liées à la polymérisation de l'HbS au repos tandis que pour les modèles SAD et NY1DD, un stress d'H/R semble nécessaire pour déclencher l'expression de la pathologie. Il n'en reste pas moins que chaque modèle représente des caractéristiques intéressantes et qu'ils doivent être choisis en fonction de la problématique posée.

Partie 2 : Vaso-occlusion  
et drépanocytose, un  
processus multifactoriel

Comme nous avons pu le souligner dans la partie précédente, le processus d'occlusion vasculaire est multifactoriel et nécessite l'intervention de plusieurs mécanismes physiologiques. Ces mécanismes sont normalement destinés à assurer le bon fonctionnement de l'organisme mais chez les sujets drépanocytaires, leur fonctionnement va se trouver altéré et aboutir à des effets délétères. Nous étudierons ainsi dans cette partie les mécanismes d'inflammation, d'adhésion vasculaire, de coagulation sanguine, de modulation du tonus vasculaire ou encore de stress oxydatif à travers une présentation générale de ces processus puis de leur implication dans les occlusions vasculaires drépanocytaires.

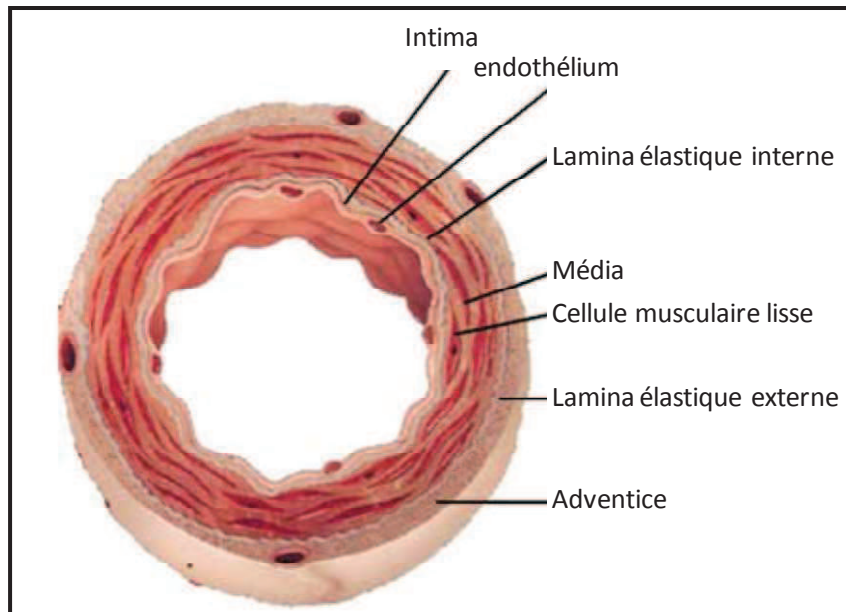
## I. L'INFLAMMATION

### I.1. PRESENTATION DE L'INFLAMMATION

#### I.1.i. GENERALITES

L'inflammation ou cascade inflammatoire est un processus mis en place par l'organisme pour réparer tout tissu endommagé ou lésé grâce à une succession de réactions et d'activités cellulaires. Elle repose, entre autres, sur deux mécanismes qui seront approfondis dans les prochains chapitres : l'adhésion vasculaire et la cascade de coagulation (147).

Le site où se met en place cette cascade inflammatoire est le réseau vasculaire, bordé par les cellules endothéliales (CE) qui sont organisées en une couche jointive et plus ou moins perméable appelée l'intima (figure 11). Les CE ont, à l'état basale, des caractéristiques anti-thrombotiques, anticoagulantes et peuvent contrôler le flux sanguin (148). Ainsi, toutes les lésions induites à ces cellules conduisent à un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire, caractérisé par une perte partielle ou complète de la balance entre vasodilatation et vasoconstriction ainsi qu'entre thrombose et thrombolyse (148).



**Figure 11 : Anatomie d'un vaisseau sanguin.**  
Traduit de Davis et al. (149)

Le processus inflammatoire débute en réaction à une lésion tissulaire ou vasculaire causée par toutes sortes d'événements tels que un dégât mécanique, un agent infectieux/pathogène, un dégât chimique, une brûlure, des dérivés réactifs de l'oxygène, un dégât tissulaire dû à une absence d'oxygénation etc... (147). L'inflammation va être initiée par la libération de chimiokines par les cellules endommagées ou les agents pathogènes (150), qui vont varier selon les différents types d'inflammation (151). Celles-ci vont avoir pour rôle d'attirer les cellules participant à la réparation de la blessure sur la zone lésée (151). Les premières cellules à détecter ces signaux sont les plaquettes, qui vont venir se lier soit à la P-sélectine (152) et au vWF (facteur von Willebrandt) (153) de l'endothélium, soit à la matrice extracellulaire (MEC) sous-endothéliale en cas de lésions endothéliales importantes. Les molécules faisant le lien entre MEC et plaquettes sont les différents types de collagène, le vWF, la fibronectine, et d'autres protéines adhésives telles que la laminine, ou la thrombospondine (TSP) (154). Ces liaisons endothélium/plaquettes vont activer les plaquettes qui vont alors déclencher une réponse adaptée au dommage avec d'une part une agrégation plaquettaire, provoquant une stase, et d'autre part le recrutement de différents types de leucocytes en fonction de la cause de la lésion (151-152). En parallèle, une dilatation vasculaire et une augmentation de la perméabilité vasculaire sont observées afin (i) de diminuer la pression sanguine, ce qui augmente la stase et donc facilite le

rapprochement des leucocytes vers l'endothélium, et (ii) de faciliter leur migration trans-endothéliale (147) (figure 12).

Ce recrutement leucocytaire, qui s'effectue via les plaquettes activées mais aussi par les chimiokines libérées par la zone lésée, induit la migration des leucocytes en bordure du vaisseau et leur liaison à la P-sélectine endothéliale. Les leucocytes vont alors rouler<sup>3</sup> (« rolling » en anglais) le long de l'endothélium et être activés (150). Cette activation entraîne l'expression d'intégrines à leur surface, permettant ainsi la fixation de ces cellules par des liaisons fortes à des molécules d'adhérence vasculaire dont ICAM-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule-1) (155). Cette adhérence vasculaire initie la migration trans-endothéliale<sup>4</sup> des leucocytes vers le lieu de la lésion (151). Une fois la migration effectuée, les leucocytes sécrètent des cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ ) qui vont amplifier la réaction inflammatoire en activant l'endothélium vasculaire et d'autres leucocytes. L'activation de l'endothélium vasculaire est caractérisée par une surexpression de molécules d'adhérence vasculaire telles que P-sélectine, ICAM-1, VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), et TF (facteur tissulaire impliqué dans l'agrégation plaquettaire). En parallèle, IL-8 va agir comme un agent chimiotactique pour les leucocytes (figure 12) (151). Cela va donc conduire à un piégeage plus important de leucocytes et un afflux plus important de ces cellules sur le site endommagé (151).

Une fois en place, les leucocytes participent à la réparation de la lésion en phagocytant les cellules endommagées et permettent à des nouvelles cellules de les remplacer (147). Si l'inflammation a été causée par une infection bactérienne, virale ou autre agent pathogène, les leucocytes (macrophages dérivés des monocytes et neutrophiles) participent alors à l'immunité innée en collaboration avec les molécules du complément.

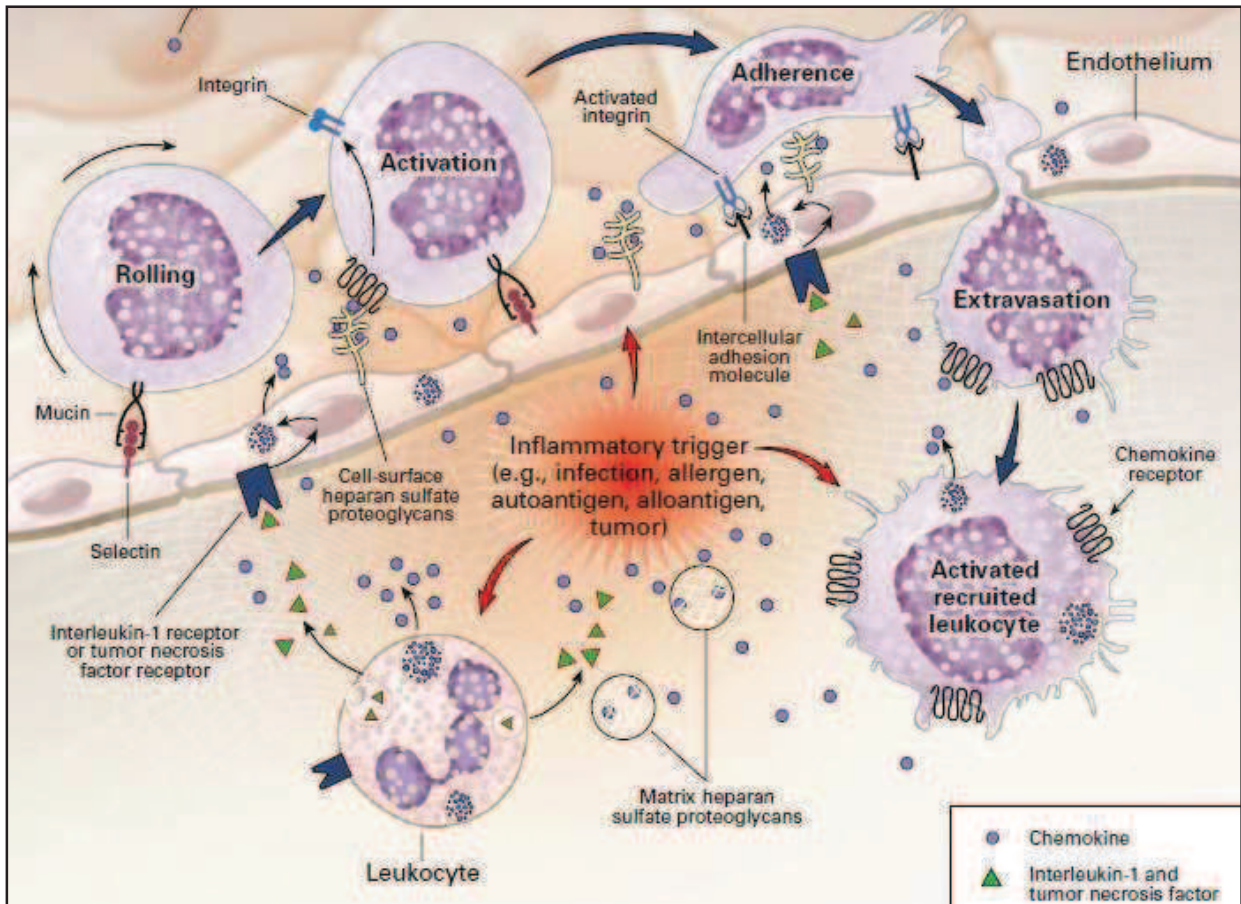
Enfin, suite à la réparation/désinfection du tissu et grâce à l'intervention, entre autre, de cytokines anti-inflammatoires, le processus inflammatoire va être résorbé. Cependant il arrive parfois qu'il y ait une accumulation persistante de leucocytes activés, ce qui conduit à une inflammation chronique qui suggère un dysfonctionnement des mécanismes régulateurs (156).

---

<sup>3</sup> Rolling : action d'un leucocyte sur l'endothélium qui va se déplacer tout en adhérant à la membrane

<sup>4</sup> Migration trans-endothéliale ou diapédèse : migration du leucocyte à travers l'intima en passant soit entre les cellules endothéliales soit dans des pores creusés à l'intérieur des cellules endothéliales (147).





**Figure 12 : Régulation des mouvements leucocytaires par les chimiokines.**

Les chimiokines sont sécrétées sur le site du dommage nécessitant une réponse inflammatoire afin de guider les leucocytes en périphérie du vaisseau et initier leur migration par la liaison à des sélectines. Il en résulte l'activation du leucocyte qui va alors adhérer à l'endothélium par des liaisons intégrine/ICAM-1, ce qui va lui permettre de modifier sa morphologie pour passer la barrière endothéliale et migrer vers le lieu de la lésion. Une fois sur place, il va sécréter des chimiokines (IL-8) et des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) qui vont activer l'endothélium. Cela va augmenter la concentration en molécules d'adhérence vasculaire ainsi que la libération de chimiokines et donc amplifier la migration leucocytaire et la réponse inflammatoire. Schéma de Luster (151).

### I.1.ii. CYTOKINES

L'interféron, une molécule protégeant les cellules des infections virales, est le premier facteur soluble découvert en 1957 par Isaacs et Lindenmann (157). Cela marqua le début des recherches sur les cytokines et depuis, plus de 90 cytokines et récepteurs de cytokines ont été identifiés (158). Les cytokines font parties des messagers chimiques solubles qui permettent d'assurer la communication intercellulaire dans l'organisme au même titre que les hormones, les neurotransmetteurs ou encore les facteurs de croissance. Ce terme regroupe plusieurs familles de molécules dont les interleukines (IL; qui agissent généralement entre les leucocytes), les chimiokines (messager chimique qui permet d'attirer des cellules à l'endroit où elles doivent agir), les interférons ou encore les facteurs de

nécrose tumorale (TNF) qui vont essentiellement agir dans la médiation de l'immunité innée et l'inflammation en réponse à un signal activateur (159). Il est difficile de classifier les cytokines car chacune dispose de son propre fonctionnement : elles peuvent être produites par plusieurs types cellulaires ; être soit sécrétées, soit membranaires, ou encore avoir une action autocrine (action sur la cellule qui l'a sécrétée), paracrine (action sur une cellule voisine) ou endocrine (effet sur des cellules éloignées de la cellule productrice) (159).

Les deux principales cytokines pro-inflammatoires de l'organisme sont TNF- $\alpha$  et IL-1 :

❖ IL-1 est une cytokine existant sous deux formes : IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , qui sont deux molécules exerçant à peu près les mêmes fonctions et se liant toutes les deux à leur récepteur IL-1R (158,160-161). Elles sont sécrétées par un grand nombre de cellules dont les macrophages, les neutrophiles et les CE. Une fois fixées à leur récepteur IL-1R, elles vont induire la stimulation de la voie de transduction NF $\kappa$ B (156) et conduire à la production d'un grand spectre de cytokines et chimiokines (IL-8) ainsi que l'expression de molécules d'adhérence vasculaire (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine) au niveau des CE (160). Cela va permettre le recrutement des cellules circulantes pour participer à la réaction inflammatoire (160). Les cytokines IL-1 disposent d'un antagoniste naturel : IL-1Ra qui peut se lier par compétition au récepteur IL-1R mais qui n'induit aucune réponse cellulaire (160). Ainsi, le ratio IL-1/IL-1Ra pourrait fournir des informations quant à l'état inflammatoire de l'organisme qui est plutôt pro ou anti-inflammatoire (161).

❖ TNF- $\alpha$  : c'est une des cytokines les plus étudiées et ciblées sur le plan thérapeutique car elle joue un rôle fondamental dans l'inflammation, la défense contre les pathogènes intracellulaires (158) mais aussi dans la défense anti-tumorale, ce qui lui doit son nom (162). Deux types de récepteurs pour TNF- $\alpha$  ont été identifiés: TNF1R exprimé sur pratiquement toutes les cellules et TNF2R exprimé préférentiellement sur les cellules hématopoïétiques (158,162). La liaison de TNF- $\alpha$  sur TNF1R peut amener à deux réponses différentes en fonction du contexte : soit à l'activation de la voie NF $\kappa$ B qui participe à la réponse inflammatoire et stimule la survie cellulaire, soit à l'activation de la voie de la caspase 8 conduisant à l'apoptose cellulaire (162). Une dérégulation dans l'expression de TNF- $\alpha$  ou une mauvaise inhibition peuvent être préjudiciables pour l'organisme et ont été associées au choc septique et à beaucoup d'autres maladies inflammatoires et auto-immunes (158).

IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  sont connues pour activer un large panel de cytokines telles que IL-6, une cytokine pro-inflammatoire pouvant dans certains cas devenir anti-inflammatoire en activant la sécrétion des cytokines IL-1Ra et IL-10 (163-164). IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire participant à l'inhibition de la production de cytokine par les macrophages (161) ainsi qu'à un large éventail de réponses immunitaires et inflammatoires (160).

## I.2. INFLAMMATION ET DREPANOCYTOSE

Le statut inflammatoire des patients drépanocytaires est généralement étudié par le biais de l'analyse des concentrations plasmatiques en cytokines pro- ou anti-inflammatoires ainsi que des concentrations en leucocytes circulants. Il existe cependant des disparités de résultats au sujet des concentrations plasmatiques en cytokines variant avec l'âge de la population ou encore la sensibilité des kits de dosage utilisés (tableau 1 et 2). Les cytokines répondant de plus à un stimulus, la période du dosage est importante, sous peine de voir leurs concentrations passer en dessous des seuils de détection.

Le premier questionnement sur le lien drépanocytose et inflammation porte sur l'existence, à l'état stable (c'est à dire à distance de toute crise vaso-occlusive), d'un statut pro-inflammatoire. Ce statut pourrait induire la présence continue de cytokines circulantes et délétères aux patients drépanocytaires car possiblement impliquées dans la récurrence des CVO. Plusieurs études font état de concentrations basales élevées en CRP (protéine C réactive)<sup>5</sup>, une molécule pro-inflammatoire, chez des enfants ou adultes HbSS comparés à des sujets sains HbAA (165-171) bien que dans une autre étude les concentrations en CRP semblent normales (172). De plus, à l'état stable, des concentrations plasmatiques anormalement élevées en IL-8 (165,173-176), IL-2 (177), TNF- $\alpha$  (172-174,178-181), IL-1 $\beta$  (173,176,178) et IL-6 (166,173,176,179,182-183), IL-17 et IL-18 (184) ont aussi été observées (tableau 1). Enfin, les numérations leucocytaires chez les drépanocytaires sont elles aussi élevées, avec des comptes en neutrophiles, monocytes, éosinophiles et lymphocytes significativement supérieurs chez les sujet HbSS à l'état stable par rapport à des sujets HbAA (165,185). Ces résultats suggèrent que les drépanocytaires pourraient présenter un statut inflammatoire chronique. Ainsi, comme la balance entre l'état stable et la CVO est fragile, une inflammation ou une infection peut rapidement la faire pencher du côté des

---

<sup>5</sup> Protéine C réactive : protéine de la phase aiguë, marqueur de l'activité pro-inflammatoire et sécrétée par le foie après stimulation par les cytokines IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$

occlusions vasculaires (186-187). Mais cette conclusion est à nuancer puisque dans certaines études, les concentrations plasmatiques de ces cytokines (CRP, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL10) semblent normales à l'état stable (165,167-168,172,175-176,188-191) (tableau 1).

La deuxième question est de savoir comment se comportent ces marqueurs de l'inflammation pendant les CVO (tableau 2). Vis-à-vis de la CRP, toutes les études convergent vers le même résultat, à savoir une augmentation de la CRP plasmatique durant la CVO (169,176,192-194). De plus, les concentrations de CRP augmentent avec la sévérité de la maladie (indice prenant en compte le nombre d'épisodes douloureux, d'infections, de complications, de transfusions et des concentrations en LDH et Hb) (195). Pour ce qui est des concentrations plasmatiques en TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8, les résultats sont moins tranchés : certaines études rapportent des concentrations supérieures en situation de crise à celles de sujets drépanocytaires asymptomatiques (176-178,181,190-191,196), d'autres ne mesurent pas de différences significatives (173,175-176,197) tandis qu'une étude observe même une diminution des cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 durant la CVO (173). Ces différences de résultats pourraient s'expliquer par (i) la variabilité d'intensité de la crise, (ii) le moment de la crise où est effectué le prélèvement, et (iii) le choix des patients HbSS à l'état stable, qui peuvent être plus ou moins asymptomatiques.

	Références	Catégorie	Pro-inflammatoire					Pro/Anti-inflammatoire	Anti-inflammatoire
			CRP	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-8	IL-2	IL-6	IL-10
Etat Stable	Akohoue et al. 2007 (165)	Enfants	↗			↗		=	
	Hibbert et al. 2005 (166)		↗					↗	↘
	Krishnan et al. 2010 (171)		↗						
	Kuvibidila et al. 1997 (167)		↗	=					
	Michaels et al. 1998 (175)			=		↗			
	Taylor et al. 1995 (182)							↗	
	Duits et al. 1998 (190)	Enfants + Adultes				=			
	Goncalves et al. 2001 (191)					=			
	Taylor et al. 1999 (188)				=				
	Asare et al. 2010 (189)	Adultes			=				
	Barbeau et al. 2001 (172)		=	↗				=	
	Cerqueira et al. 2011 (184)								=
	Francis et al. 1992 (178)			↗ (18/21)	↗ (3/21)				
	Lanaro et al. 2009 (174)			↗		↗			=
	Mohan et al. 2005 (168)		↗					=	
	Nur et al. 2011 (169)		↗						
	Qari et al. 2012 (173)			↗	↗	↗		↗	↗
	Schnog et al. 2004 (170)		↗						
	Tavakkoli et al. 2004 (181)			↗					
	Musa et al. 2010 (177)	Non précisé					↗		↗
Kasschau et al. 1996 (179)			↗ (2/9)				↗ (6/9)		
Malavé et al. 1993 (180)			+ détecté chez SS						
Pathare et al. 2004 (176)			=	↗		↗ (p<0,09)		↗	

**Tableau 1 : Etat des concentrations plasmatiques en cytokines pro- ou anti-inflammatoires chez des sujets drépanocytaires à l'état stable comparés à des sujets sains.**

Entre parenthèse est indiqué le nombre de sujets HbSS à l'état stable montrant une concentration en cytokine élevée par rapport au nombre totale de patients HbSS à l'état stable étudiés.

	Références	Catégorie	Pro-inflammatoire					Pro/Anti-inflammatoire	Anti-inflammatoire	Variation comparé à des HbAA ou des HbSS stable
			CRP	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-8	IL-4	IL-6	IL-10	
Pendant CVO	Michaels et al. 1998 (175)	Enfants		=		=				HbSS stable
	Mohammed et al. 2010 (194)		↗							HbSS stable
	Akinola et al. 1992 (192)	Adultes	↗							HbSS stable
	Francis et al. 1992 (178)			↗ (13/19)	↗ (3/19)					HbAA
	Graido-Gonzalez et al. 1998 (197)			=	=	=		=	↗ (p=0,07)	HbAA
	Nur et al. 2011 (169)		↗							HbSS stable
	Qari et al. 2012 (173)			↘	↘	=		↘	=	HbSS stable
	Tavakkoli et al. 2004 (181)			↗ (p=0,1)						HbSS stable
	van Beem et al. 2009 (196)					↗				HbSS stable
	Goncalves et al. 2001 (191)		Enfants +Adultes				↗			
	Duits et al. 1998 (190)					↗				HbSS stable
	Bargoma et al. 2005 (193)	Non précisé	↗							HbSS stable
	Musa et al. 2010 (177)						↗		↘	HbSS stable
	Pathare et al. 2004 (176)		↗	↗ (p<0,09)		=		↗		HbSS stable

Tableau 2 : Evolution des concentrations plasmatiques en cytokines pro- ou anti-inflammatoires chez des sujets drépanocytaires pendant une CVO comparés à des sujets drépanocytaires à l'état stable ou à des sujets sains.

Entre parenthèse est indiqué le nombre de sujets HbSS en CVO montrant une élévation de la concentration en cytokine sur le nombre total de patients HbSS en CVO étudiés.

## II. L'ADHESION VASCULAIRE

### II.1. MOLECULES D'ADHERENCE VASCULAIRE

Comme nous avons pu le décrire dans le précédent chapitre, les mécanismes d'adhésion vasculaire permettent de lier les leucocytes lors de la réponse inflammatoire, ce qui initie la diapédèse et permet ainsi de maintenir l'intégrité des tissus. Pourtant, chez les sujets drépanocytaires, cette adhésion des cellules sanguines circulantes à l'endothélium vasculaire activé est un mécanisme très problématique. En effet, elle aboutit à une limitation de la lumière vasculaire qui peut générer des sites occlusifs et des crises vaso-occlusives.

Ce mécanisme s'appuie sur des molécules d'adhérence vasculaire qui se divisent en deux grandes familles comprenant les sélectines et la super famille des immunoglobulines. Ces molécules interagissent pour la plupart avec des intégrines exprimées à la surface des cellules adhérentes.

#### II.1.i. LA SUPER FAMILLE DES IMMUNOGLOBULINES

Cette famille est constituée de molécules présentant une chaîne simple de glycoprotéines qui jouent un rôle central dans les liaisons fortes leucocyte-endothélium précédant les migrations trans-endothéliales (155). Les principales molécules de cette famille sont ICAM-1 et VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), qui sont exprimées à la surface de l'endothélium vasculaire activé. Elles se lient respectivement aux intégrines LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen-1)/Mac-1 et VLA-4 (Very Late Antigen-4) (tableau 3) (198).



	Famille	Expression à l'état stable	Inducteurs de leur expression	Temps minimum de stimulation	Lieu d'expression	Type de leucocyte y adhérent	Ligand connu
<b>ICAM-1</b>	Ig	Faible	IL-1, TNF- $\alpha$ , interféron $\gamma$	16h-24h	Fibroblaste ; cellule endothéliale, épithéliale, muqueuse ; lymphocyte et monocyte	Tous	LFA-1, Mac-1
<b>VCAM-1</b>	Ig	Très faible	IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-4	12h-24h	Cellule endothéliale, épithélium du tubule rénal, cellule lymphoïde et macrophage tissulaire	Monocyte, lymphocyte, éosinophile	VLA-4
<b>E-sélectine</b>	Sélectine	Absente	IL-1 ; TNF- $\alpha$	2-6h	Cellule endothéliale	Monocyte, neutrophile, Lymphocyte T	ESL-1 (Mucine) L-sélectine
<b>P-sélectine</b>	Sélectine	Absente	Histamine, thrombine	5-30min	Cellule endothéliale et plaquette	Monocyte, neutrophile	PSGL-1 (Mucine)

**Tableau 3 : Caractéristiques des molécules d'adhérence vasculaire endothéliales.**

Ig : famille des immunoglobulines. Traduit de Beekhuizen et al. (199)

ICAM-1 est une molécule qui peut être exprimée sur un grand nombre de cellules dont les CE mais aussi sur les fibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules des muqueuses, les lymphocytes et les monocytes (200). VCAM-1 est plus spécifique aux CE bien que sa présence ait été rapportée sur l'épithélium de tubules rénaux, les cellules lymphoïdes dendritiques et les macrophages tissulaires (199). L'expression de ces deux molécules étant très faible au repos, elle nécessite une stimulation des CE par IL-1 et TNF- $\alpha$ , ce qui va activer la voie du facteur de transcription NF $\kappa$ B. Celui-ci se transloque dans le noyau afin d'activer l'expression génique, entre autre, de ICAM-1 et VCAM-1 (156,201). Ainsi, il existe un délai d'attente entre le stimulus inflammatoire et l'expression des protéines qui est de 12 à 24h (199).

### II.1.ii. LES INTEGRINES

Les intégrines sont des molécules hétérodimériques constituées d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ . Cette dernière permet de définir à quelle famille l'intégrine appartient. Il y a 15 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  pour former au moins 19 intégrines différentes (200). Les



deux principales familles sont les intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 2$ , qui participent au recrutement des leucocytes (155).

La famille des  $\beta 1$ , dont VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ ) est la plus importante, et a la particularité de lier le fibrinogène, le facteur von Willebrand ainsi que des composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, la laminine et la fibronectine (200,202). Cela joue un rôle très important dans la cascade de coagulation et la réparation endothéliale (199). VLA-4 est exprimé sur les réticulocytes, monocytes, lymphocytes et éosinophiles et permet de lier VCAM-1 (203-204).

Les intégrines de la famille  $\beta 2$  sont exprimées exclusivement sur les leucocytes et jouent un rôle très important dans la réaction immunitaire en permettant aux leucocytes de rejoindre les lieux de l'infection. Il a en effet été montré qu'une déficience en intégrine  $\beta 2$  (personnes atteintes de déficit d'adhésion leucocytaire) induisait des infections récurrentes causées par une absence de neutrophiles sur les lieux de l'infection (155,199). Les intégrines  $\beta 2$  les plus importantes sont LFA-1 ( $\alpha_M\beta_2$ ) et Mac-1 ( $\alpha_L\beta_2$ ) qui vont lier ICAM-1 par des liaisons fortes (200,203).

### II.1.iii. LES SELECTINES ET LEURS LIGANDS, LES MUCINES

Les sélectines sont des glycoprotéines transmembranaires impliquées dans le recrutement initial des leucocytes sur le lieu de l'inflammation. Elles sont exprimées sur les leucocytes (L-sélectine), les plaquettes (P-sélectine) et l'endothélium vasculaire (E- et P-sélectine) (tableau 2). Leurs ligands, qui font partie de la famille des mucines, sont PSGL-1 (P-sélectine glycoprotéine ligand-1) pour P-, E- et L-sélectine et ESL-1 (E-sélectine ligand-1) pour E-sélectine (205). La liaison entre leucocytes et sélectines est modérément forte afin de maintenir la liaison avec le leucocyte tout en lui permettant de rouler le long de l'endothélium.

Lors d'un épisode inflammatoire, E-sélectine est activée par TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  qui, en stimulant la voie de NF $\kappa$ B, induisent son expression au niveau de l'endothélium vasculaire en 4 à 6h (199). Elle va alors lier les leucocytes et plus spécifiquement les neutrophiles et les monocytes pour participer aux premières étapes du recrutement des leucocytes (198).

Il semblerait que P-sélectine soit une des molécules initiatrices de l'adhésion endothéliale car son mode d'expression lui permet une très grande réactivité. En effet, P-

sélectine est présente constitutivement dans les corps de Weibel-Palade des CE, ce qui permet, suite au stimulus effectué par l'histamine et/ou la thrombine, une fusion des vésicules avec la membrane des CE et l'expression de la sélectine en 5 à 30 minutes (199). La liaison de P-sélectine à PSGL-1, situé sur les leucocytes, induit l'activation leucocytaire grâce à un signal intracellulaire. Cela aboutit à l'externalisation d'intégrines participant à l'adhésion des cellules aux molécules d'adhérence vasculaire avant la migration trans-endothéliale (206).

Enfin, L-sélectine est exprimée sur les monocytes, où elle facilite le roulement de ces cellules le long de l'endothélium en les liant à E et P-sélectine des CE (199).

#### II.1.iv. LES MOLECULES D'ADHERENCE SOLUBLES

Les molécules d'adhérence vasculaire faisant partie de la superfamille des immunoglobulines (ICAM-1, VCAM-1) et des sélectines (E-,P-, et L-sélectine) présentent la particularité d'exister sous une forme soluble dans le plasma. Les mécanismes de libération de ces molécules solubles, auxquelles il manque la partie transmembranaire et parfois cytosolique (206-207) sont peu connus. Cette libération pourrait être causée par :

- ❖ des clivages protéolytiques qui les détacheraient de l'endothélium via des complexes enzymatiques situés en surface ou enchâssés dans la membrane cellulaire (208)
- ❖ un clivage via un processus pathologique (par des protéases dérivées de neutrophiles ou des ROS) (209)
- ❖ à un épissage alternatif de l'ARNm (Acide Ribonucléique messenger) qui produiraient des molécules solubles libérées directement dans le plasma (207-208).

Ces molécules solubles sont présentes dans le plasma en quantités relativement faibles en situation physiologique. En revanche, elles sont surexprimées dans différents cas pathologiques comme les cancers, l'hypertension artérielle pulmonaire, les pathologies inflammatoires et/ou auto-immunes, le diabète, les AVC, les infarctus du myocarde ou les chocs septiques (207,209-211). De plus, des relations ont été observées entre la survenue de ces pathologies, impliquant souvent un processus inflammatoire, et les niveaux plasmatiques de ces molécules solubles (206), ce qui suggère qu'elles pourraient être des marqueurs de dommage cellulaire et d'activation de l'endothélium vasculaire (209). En effet, Leeuwenberg et al. montrent, dans une étude *in vitro*, une expression endothéliale puis une

expression des molécules solubles selon la même cinétique mais avec un décalage temporel entre les deux formes (212).

Il reste tout de même une question en suspend au sujet de ces molécules solubles: quelles conséquences sont engendrées par leur libération sur la réponse inflammatoire. Est-ce un mécanisme plutôt pro-inflammatoire qui va, comme les molécules d'adhésion membranaire, participer à la stimulation de l'inflammation ou bien anti-inflammatoire qui va induire la résorption du processus ?

L'aspect anti-inflammatoire pourrait se justifier par la présence, sur les molécules solubles, du domaine reconnaissant les intégrines ou mucines. Cela permettrait donc des liaisons au niveau circulatoire entre les molécules solubles et les ligands des leucocytes, ce qui diminuerait les interactions leucocytes/endothélium. Cela a été démontré par Gamble et al. en 1990 avec sE-sélectine qui diminuerait *in vitro* l'interaction entre neutrophiles et endothélium (213).

Cependant, plusieurs études plus récentes font état d'un effet pro-inflammatoire de ces molécules avec l'étude principalement de sP-sélectine. Woollard et al. ont montré, *in vitro*, qu'une augmentation de sP-sélectine induisait une augmentation de l'adhésion leucocytaire à une mono-couche de plaquettes. Ceci pourrait s'expliquer par les mécanismes d'activation leucocytaire. En effet, la liaison entre PSGL-1 – situé sur la membrane des leucocytes – et P-sélectine, active les leucocytes via la transduction d'un signal intracellulaire induisant l'expression d'intégrines permettant leurs liaisons à l'endothélium et aux plaquettes. Ainsi sP-sélectine pourrait induire l'activation des leucocytes et donc augmenter leur adhérence (206). Il a, de plus été montré que l'expression de sP-sélectine était liée à une augmentation de P-sélectine plaquettaire chez des primates non-humains (214). Un état pro-coagulant et une expression accrue du facteur tissulaire ont par ailleurs été observés chez des souris surexprimant sP-sélectine (215).

Ainsi, la balance semble pencher du côté des effets pro-inflammatoires pour ces molécules solubles, ce qui pourrait expliquer leur présence à de fortes concentrations dans les pathologies à composante inflammatoire.

## **II.2. ADHESION VASCULAIRE ET DREPANOCYTOSE**

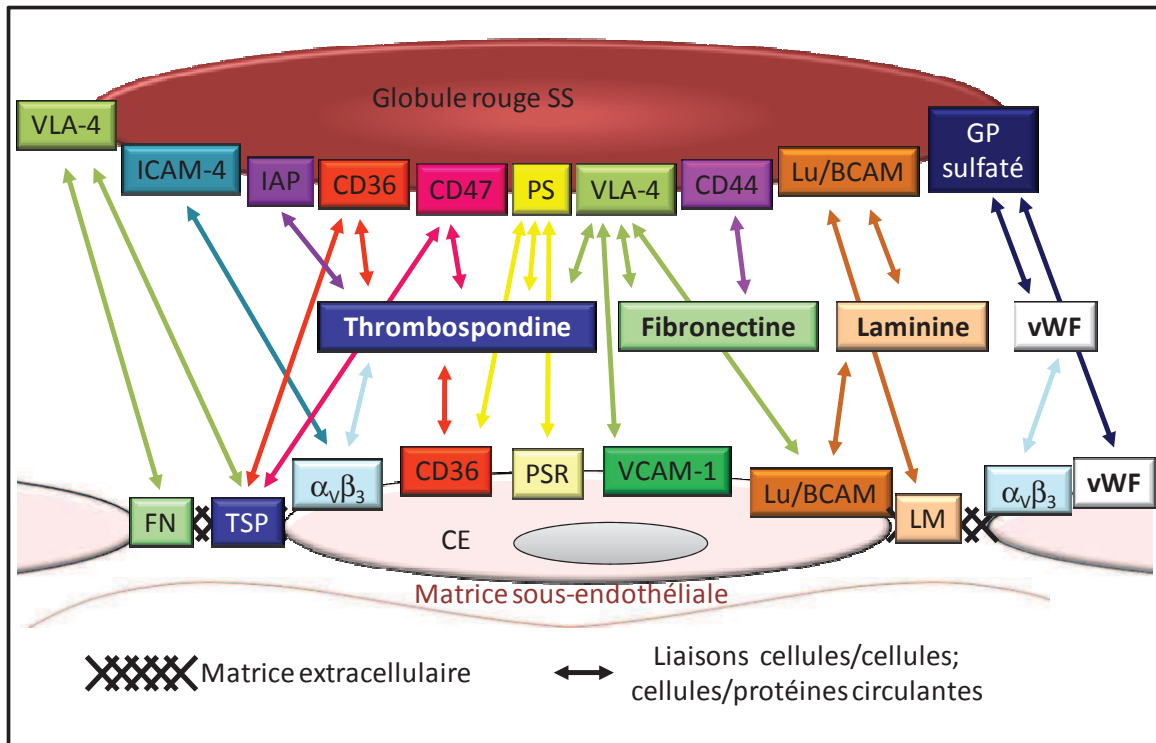
La drépanocytose est caractérisée par un dysfonctionnement endothélial qui conduit notamment à une adhérence vasculaire accrue, fortement impliquée dans les CVO (92). Cette adhérence concerne les GR SS (ils représentent les GR porteurs de la mutation HbS), les leucocytes et l'endothélium. Il en résulte des interactions GR SS/endothélium, GR SS/leucocytes et leucocytes/endothélium. Ces adhésions multicellulaires s'organisent préférentiellement au niveau des veinules postcapillaires et des capillaires (59).

### **II.2.i. L'ADHESION GR SS/ENDOTHELIUM**

A l'inverse des GR de sujets sains, les GR SS présentent la particularité de pouvoir adhérer anormalement à l'endothélium vasculaire via l'expression inhabituelle de récepteurs aux molécules d'adhérence (216-218) (figure 13). Ces récepteurs sont normalement destinés à guider la maturation des GR durant l'érythropoïèse ainsi que sa destruction par le système réticuloendothélial, et non à adhérer à l'endothélium vasculaire (219-220). L'expression anormale de ces récepteurs à la surface des GR SS pourrait être due à l'importante réticulocytose induite par l'hémolyse, qui nécessite une libération très rapide de GR par la moelle osseuse (218,221). La demande étant trop importante, la moelle osseuse pourrait libérer des réticulocytes immatures, appelés réticulocytes de stress, et exprimant à leur surface des récepteurs normalement exprimés sur les progéniteurs érythroïdes (218,221-222). Ils expriment alors, en plus des molécules normalement présentes sur les membranes érythrocytaires (ICAM-4, Lu/BCAM et CD47), les récepteurs CD36 et VLA-4 (216-219). CD36 est connu pour se lier à la TSP (223) qui existe sous forme circulante ou enchâssée dans la MEC, et peut se fixer à une multitude de ligands situés sur la membrane des CE (ex : CD36,  $\alpha_V\beta_3$ ). La TSP constitue ainsi un pont liant les GR SS et les CE (216-217,219). La TSP semble être une des molécules centrales dans les interactions GR SS/endothélium puisqu'en plus de se lier à CD36, elle adhère aussi à la PS externalisée des GR SS ainsi qu'au CD47 et VLA-4 érythrocytaire (219) (figure 13).

CD47 est un récepteur à la TSP qui a la caractéristique, une fois lié par la TSP, d'activer l'expression membranaire de l'intégrine VLA-4 (221,224). L'activation de VLA-4, qui n'est exprimée que sur les jeunes réticulocytes immatures (soit environ 25% des réticulocytes chez les sujets drépanocytaires) (218), permet la liaison des GR SS à VCAM-1 ou Lu/BCAM

(lutheran/basal cell adhesion molecule) au niveau des CE. De plus, VLA-4 interagit avec la fibronectine plasmatique ou endothéliale et la TSP (224-225). Ainsi, la TSP, qui est fortement concentrée chez les sujets drépanocytaires en situation de crise (226), stimule l'activation de VLA-4 en se liant avec CD47 sur les GR SS. Cela augmente la quantité de VLA-4 disponible pour se lier à la TSP et donc le risque d'adhésion endothéliale puisque la TSP peut aussi se lier aux CE via CD36 et  $\alpha_v\beta_3$ .



**Figure 13 : Interactions entre les molécules endothéliales, érythrocytaires et les protéines circulantes menant aux liaisons GR SS/endothélium chez les sujets drépanocytaires.**

CD : cluster de différenciation; FN : fibronectine; GP : glycoprotéine; LM : laminine; PSR : récepteur de la phosphatidylsérine. Adapté de Cartron et al. (219).

Enfin, une nouvelle catégorie de molécules d'adhérence nécessitant une activation par un signal de transduction a été plus récemment décrite dans le cadre de la drépanocytose ; il s'agit de IAP (integrin-associated protein), Lu/BCAM et ICAM-4, ces deux dernières étant surexprimées sur les GR SS (219,227). Elles vont lier respectivement la TSP, la laminine plasmatique et enchâssée dans la MEC et  $\alpha_v\beta_3$  sur les CE (219,223,228-229). Cela fait d' $\alpha_v\beta_3$  une molécule endothéliale très impliquée dans les liaisons GR SS/CE car elle peut lier ICAM-4, vWF, TSP et possiblement la laminine (59,92). A noter que le vWF plasmatique permet de faire le lien entre  $\alpha_v\beta_3$  endothéliale et les glycoprotéines sulfatées présente au niveau des

membranes des GR (92). Enfin, l'activation de ICAM-4 et de Lu/BCAM par l'adrénaline augmente, *in vitro* et *in vivo*, les adhésions GR SS/endothélium ainsi que l'occurrence des CVO (229-230).

Ces mécanismes d'adhésion GR SS/endothélium dépendent donc d'une multitude de liaisons directes ou indirectes via les molécules circulantes ou enchâssées dans la MEC (TSP, laminine, fibronectine). Ils sont considérés comme des étapes critiques dans la genèse des CVO (217). En effet, l'adhérence GR SS/endothélium est corrélée positivement avec la sévérité de la drépanocytose (231). Ces agrégats peuvent conduire à des zones de stase, ce qui peut favoriser la stimulation de l'expression endothéliale des molécules d'adhérence (228), les adhésions leucocytes/endothélium (224,232), les piégeages des GR denses et irréversibles, augmenter le temps de passage des GR SS et donc leur possibilité de devenir falciformes (92) et conduire aux occlusions vasculaires avec forte diminution ou arrêt du flux sanguin (224).

#### II.2.ii. L'ADHESION LEUCOCYTES/ENDOTHELIUM

L'adhésion leucocytes/endothélium est un autre type d'interaction intercellulaire pouvant mener aux CVO (233). De hautes concentrations basales en leucocytes ont été associées à une importante sévérité de la maladie (234-236). Ainsi, les infections, qui entraînent une réponse inflammatoire aigüe, sont associées à un risque élevé de CVO (237).

De multiples facteurs (stress oxydatif après ischémie-reperfusion ou hémolyse, dommages endothéliaux, infections...) sont susceptibles d'activer l'endothélium vasculaire et de conduire à la fixation des leucocytes le long de cet endothélium. Cette activation se produit via la voie de NFκB qui stimule la surexpression endothéliale de molécules d'adhérence vasculaire liant les leucocytes : ICAM-1, VCAM-1 ou E-sélectine (92,237-238). En parallèle, indépendamment de la voie NFκB, P-sélectine est sécrétée par les corps de Weibel-palade des CE.

Le rôle de NFκB dans l'adhésion leucocytaire a été décrit par Kaul et al. (237) chez des souris exprimant 100% d'HbS. Ces auteurs ont observé qu'une injection de TNF-α, un activateur connu de NFκB, induisait des occlusions, initiées par des adhésions leucocytaires, aux niveaux des veinules post-capillaires (VPC) (237,239). En parallèle, un traitement à la sulfasalazine, un inhibiteur de NFκB, diminuait l'adhésion leucocytaire à l'endothélium grâce

à une diminution des molécules d'adhérence vasculaire (237,240). Les leucocytes étant moins déformables (232), plus adhérent (138,228,241), et en plus grand nombre chez les patients drépanocytaires (138,242), une augmentation de l'expression des molécules d'adhérence vasculaire peut donc conduire à un plus important piégeage de ces cellules et donc à de plus gros risques de CVO.

La P-sélectine semble jouer un rôle particulièrement important dans la genèse des CVO. Il a en effet été démontré chez des souris transgéniques drépanocytaires NY1DD présentant, suite à un stress d'hypoxie/réoxygénation (H/R), une augmentation de l'adhésion leucocytaire, que l'injection d'un anticorps (AC) anti-P-sélectine permettait d'annuler ces mécanismes d'adhésion (138). En parallèle, cet AC permet de restaurer la vitesse des GR qui était altérée suite au stress d'H/R. L'AC anti-E-sélectine n'a, en revanche, chez ce modèle de souris transgénique, aucun effet sur les adhésions leucocyte/endothélium (138).

Les leucocytes expriment un grand nombre de récepteurs qui vont participer à l'adhérence cellulaire dont (236):

- ❖ Mac-1, LFA-1 et VLA4 qui vont lier ICAM-1 et VCAM-1 des CE ;
- ❖ CD36 qui va lier la TSP qui elle-même se fixe à  $\alpha_V\beta_3$  des CE ;
- ❖ L-sélectine qui peut lier PSGL-1 présent à la surface des GB, ce qui va permettre des interactions GB/GB ;
- ❖ PSGL-1 qui va pouvoir lier P-sélectine (sur plaquette et CE), L-sélectine (sur GB) et E-sélectine (sur CE)
- ❖ CD44 exprimé par les leucocytes activés qui pourrait interagir avec l'endothélium (243) via, certainement, des liaisons avec E-sélectine (244).

### II.2.iii. L'ADHESION LEUCOCYTES/ GR SS

Plusieurs études assez récentes ont permis de mettre en avant de nouveaux types d'interactions entre les GR SS et les leucocytes qui pourraient être impliquées de manière assez importante dans les CVO.

Turhan et al. sont les premiers à avoir observé *in vivo*, par microscopie intravitale, ces interactions GR SS/leucocytes sur un modèle des souris C57Bl/6 transplantées avec de la moelle osseuse de souris BERK. Après injection de TNF- $\alpha$ , les leucocytes, et non les GR SS,

adhérait à l'endothélium. Ensuite, les liaisons entre GR SS et leucocytes se multipliaient jusqu'à conduire à une diminution drastique du flux sanguin et à d'importantes occlusions vasculaires. Ce mécanisme menant aux occlusions vasculaires était limité, voire annulé, chez des souris HbSS déficientes en P- et E-sélectine. Ces résultats suggèrent que l'adhésion des leucocytes aux sélectines endothéliales pourrait être responsable de l'augmentation de leurs capacités à lier les GR SS (239,245). Cette étude sera confirmée *in vitro* sur des cellules HUVEC avec d'importantes adhésions leucocytaire/CE et GR SS/leucocytes (monocyte, lymphocyte et neutrophile) (241,246). Ces dernières semblent être induites par la liaison entre ICAM-4 exprimée par les GR SS et LFA-1 et Mac-1 exprimés par les leucocytes. (241). L'absence d'adhérence des GR SS à l'endothélium dans ces études *in vivo* est en revanche surprenante car ces liaisons endothélium/GR SS sont observées dans d'autres études sur d'autres modèles murins SS (146). Kaul et al. suggèrent que le choix d'un modèle BERK exprimant 100% d'HbS pourrait expliquer cette absence d'adhésion GR SS/endothélium puisque ces souris sont plus appropriées dans l'étude du rôle de l'hémolyse et de l'inflammation (dont le recrutement leucocytaire) que pour évaluer la contribution des GR hétérogènes dans les événements adhésifs et obstructifs (92).

D'autres études ont confirmé la présence de ces interactions GR SS/leucocytes, mais selon une chronologie différente. Brittain et al. en 2008 puis Chaar et al. en 2010 ont observé la présence d'agrégats GR SS/leucocytes directement dans la circulation sanguine de patients drépanocytaires (247-248). Le premier article faisait état de liaisons entre réticulocytes immatures et monocytes, via les intégrines VLA-4 exprimées par les deux types de cellules. VLA-4 liant la fibronectine, celle-ci pourrait être le lien entre réticulocytes et monocytes (248). Le deuxième article, publié plus récemment, élargit le cercle des cellules touchées par ces interactions. Ces auteurs montrent qu'aussi bien les GR matures que les réticulocytes peuvent se lier aux monocytes mais aussi aux lymphocytes ce qui confirme l'étude *in vitro* de Zennadi et al (243,247). Ces interactions semblent se produire par la liaison entre LuBCAM exprimé par les GR SS et VLA-4 exprimé par les lymphocytes et monocytes (225,247).

Ainsi, il semblerait que les interactions entre cellules sanguines et endothélium ne soient pas les seules interactions pouvant conduire aux CVO mais qu'un autre type d'interaction, incluant la liaison entre GR SS et leucocytes, puisse conduire à la formation d'agrégats adhérents ou non à l'endothélium et qu'ils soient trop larges pour certains



capillaires ou VPC et conduisent à des obstructions vasculaires sévères (248). Ces interactions semblent impliquer VLA-4 leucocytaire ainsi que LuBCAM, VLA-4 érythrocytaire et la fibronectine plasmatique (247-248).

#### II.2.iv. LES MOLECULES D'ADHERENCE SOLUBLES ET DREPANOCYTOSE

Souvent utilisé dans des pathologies inflammatoires, le dosage des molécules solubles d'adhérence vasculaire semble pouvoir apporter des indications quant à l'état d'activation de l'endothélium vasculaire chez les patients drépanocytaires (249). Dans cette pathologie, les concentrations plasmatiques en sVCAM-1, sICAM-1, sP- et sE-sélectine sont plus élevées que chez des sujets sains (168-171,183-184,249-255).

La révélation, par ces molécules solubles d'adhérence, d'un état anormal de l'endothélium est confirmée par plusieurs études qui montrent que :

- ❖ Suite à un épisode de syndrome thoracique aigu, de crises douloureuses ou d'hypertension artérielle pulmonaire, le niveau de sVCAM-1 est surélevé comparé à un état asymptomatique chez les patients drépanocytaires (196,249-250,256). De même que sVCAM-1 est corrélé à des molécules plasmatiques reflétant des dysfonctions rénales et hépatiques (249).

- ❖ L'utilisation d'Hydroxyurée, molécule réduisant l'occurrence des crises douloureuses et des CVO, diminue significativement sVCAM-1, sICAM-1 et sP- et sE-sélectine plasmatiques (249,254). De même, des transfusions sanguines chroniques, qui diluent la concentration sanguine en HbS et donc le risque de dommages endothéliaux, sont associées à une diminution des concentrations plasmatiques en sVCAM-1 (250).

- ❖ L'augmentation du flux sanguin induite par une molécule mimétique du NO (nitroprusside) est inversement corrélée au niveau de sVCAM-1 (257); suggérant que sVCAM1 plasmatique pourrait être le reflet de l'expression endothéliale de VCAM-1, puisque le NO est connu pour être un inhibiteur de l'expression endothéliale de VCAM-1.

### III. HEMOSTASE ET THROMBUS, A L'INTERFACE ENTRE AGREGATION PLAQUETTAIRE ET CASCADE DE COAGULATION SANGUINE

#### III.1. COMMENT SE FORME UN THROMBUS ?

Le but de la cascade de coagulation associée à l'adhésion et l'agrégation plaquettaire est de permettre la mise en place d'un thrombus afin de réparer une zone lésée de l'endothélium vasculaire.

##### III.1.i. ADHESION ET AGREGATION PLAQUETTAIRE

Afin de répondre à un processus inflammatoire déclenché par une lésion vasculaire, nous avons pu voir que l'adhésion plaquettaire constituait la première forme d'adhésion cellulaire (cf. partie 2.1.1.i ; p45). Cela est rendu possible par la première fixation, réversible et instable, à P-sélectine, rapidement exprimée par les CE, via les récepteurs PSGL-1 et la glycoprotéine (GP) Iba exprimé par les plaquettes (206,258). Cette adhésion plaquette/P-sélectine va initier une adhésion stable plaquette/endothélium dont les mécanismes se différencient entre faible et importante contrainte de cisaillement :

- ❖ A faible contrainte de cisaillement, les plaquettes, qui expriment les intégrines GPIa/IIa ( $\alpha_2\beta_1$ ),  $\alpha_2\beta_5$  et  $\alpha_2\beta_6$  se fixent respectivement au collagène, à la fibronectine et à la laminine de la matrice sous-endothéliale exposée (258).

- ❖ A forte contrainte de cisaillement, l'intervention du vWF est nécessaire. Celui-ci va lier GPIb $\alpha$  exprimée par les plaquettes ainsi que le collagène au niveau endothélial (147,259).

Suite à la formation d'une première couche de plaquettes adhérentes au niveau de la lésion endothéliale, les liaisons vWF/GPIb $\alpha$  à forte contrainte de cisaillement, ainsi qu'une liaison inconnue à faible contrainte de cisaillement, vont induire l'activation de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  au niveau plaquettaire. Cette molécule est l'initiatrice de l'agrégation plaquettaire puisque le fibrinogène et le vWF circulant vont venir lier  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (258,260-261). Le fibrinogène ayant deux sites d'interaction avec  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , il va faire le lien entre les plaquettes afin de permettre la croissance de l'agrégat cellulaire (260). A ce stade d'hémostase primaire, un amas de plaquettes reliées entre elles de manière instable par le fibrinogène et accrochées à

la zone lésée est constitué. C'est dans le but de stabiliser cet agrégat et d'en faire un thrombus que la cascade de coagulation entre en jeu ; c'est l'hémostase secondaire (262).

### **III.1.ii. CASCADE DE COAGULATION**

Le modèle actuel de la cascade de coagulation se divise en trois phases : l'initiation de la coagulation suivie par une phase d'amplification puis de propagation (262-263) (figure 14). Ce modèle repose sur un enchainement d'événements protéolytiques localisés essentiellement en surface des plaquettes activées (261).

#### **III.1.ii.a. L'INITIATION DE LA COAGULATION**

Elle se fait par le TF (facteur tissulaire), molécule clé de cette initiation qui est exprimée par les monocytes, les cellules endothéliales dans certaines pathologies et dans de rares cas par les plaquettes (264). La particularité du TF est qu'il est membranaire et est exprimé en surface de microparticules circulantes (MP). Ces MP sont des vésicules membranaires, sortes de « bulles » de membranes, libérées par les cellules activées (monocytes, plaquettes, CE) après un clivage protéolytique du cytosquelette (261,264). Ces microparticules, qui expriment en règle générale TF, présentent aussi une surexposition de la PS en surface, ce qui améliore la fixation des facteurs pro-thrombotiques participant à la cascade de coagulation (264). Le TF, afin d'initier la coagulation, se lie au facteur VII (FVII), ce qui va l'activer en FVIIa afin de créer le complexe TF/FVIIa au niveau membranaire des microparticules. Ce complexe induit l'activation des facteurs FX et FIX en FXa et FIXa. Le FXa se lie alors à la membrane de la microparticule afin de ne pas être dégradé par des inhibiteurs de la coagulation via la voie d'inhibition du TF ou l'antithrombine (265). Le FXa induit alors l'activation du FV en FVa et le complexe FXa/FVa/Ca<sup>2+</sup> catalyse la transformation de la prothrombine en thrombine. La quantité de thrombine formée lors de cette phase d'initiation est assez faible mais en quantité suffisante pour initier la phase d'amplification (261-263).

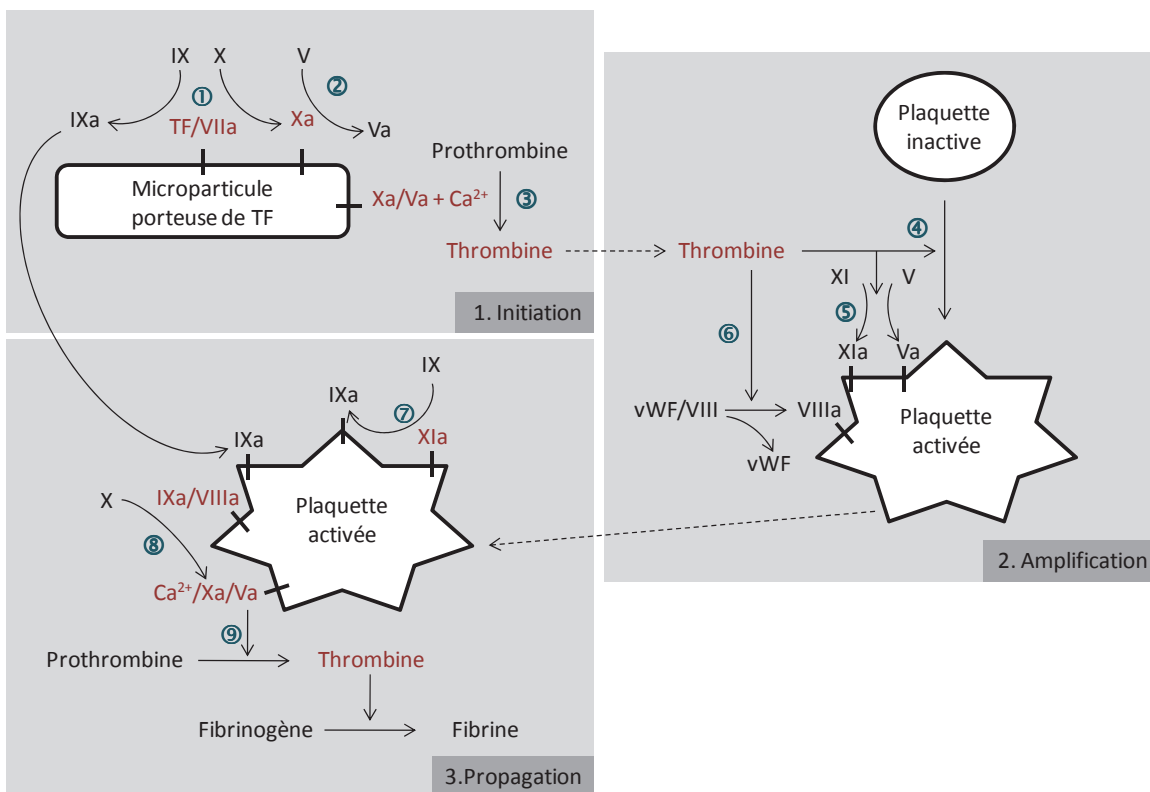
#### **III.1.ii.b. L'AMPLIFICATION DE LA COAGULATION**

Les faibles quantité de thrombine formée pendant la phase d'initiation vont aller se lier aux plaquettes adhérentes et les activer, ce qui stimule la dégranulation du facteur FV

qui va être activé en FVa (263). La thrombine induit aussi l'activation du facteur membranaire plaquettaire FXI en FXIa et le clivage du complexe vWF/FVIII. Cela conduit à la liaison du vWF à la GPIIb/IIIa plaquettaire et à l'activation du FVIII en FVIIIa (262-263). Il en résulte des plaquettes activées, présentant les facteurs FVa, FVIIIa et FXIa à leur surface.

### III.1.ii.c. LA PROPAGATION DE LA COAGULATION

Le facteur FIXa activé pendant la phase d'initiation vient se lier à la membrane des plaquettes activées et se multiplie grâce au FXIa (qui active FIX en FIXa) (262). Le complexe « tenase » formé de FIXa/FVIIIa est ensuite créé, avec l'aide de  $\text{Ca}^{2+}$  qui catalyse l'activation de FX en FXa. Ce FXa se lie rapidement au FVa afin de se protéger de l'inhibition (cf. initiation) et créer le complexe prothrombinase FXa/FVa. C'est ce complexe qui va permettre de produire une grande quantité de thrombine à partir de la prothrombine afin que celle-ci transforme le fibrinogène circulant en fibrine insoluble. L'agrégat plaquettaire maintenu par du fibrinogène plutôt instable va être alors enserré de fibrine, ce qui va créer un maillage stable avec les plaquettes et le fibrinogène. Cette agrégat sera, de plus, consolidé par le facteur FXIII (261-262).



**Figure 14 : Cascade de coagulation d'après le modèle de Monroe et al. en 2002.**

Elle s'effectue en 3 parties, initiation, amplification et propagation. Schéma adapté de Monroe et al. (263)

### III.1.ii.d. REGULATION DU THROMBUS AVEC LA FIBRINOLYSE

La fibrinolyse est un important facteur de régulation des thrombus qui permet de maintenir le flux sanguin et la perméabilité des vaisseaux. Elle implique le clivage du plasminogène circulant en plasmine par l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). Cette enzyme est exprimée par les CE stimulées par la thrombine et le facteur FXa (266). La plasmine dégrade la fibrine et lyse le caillot formé de plaquettes et de fibrines (266). La thrombomoduline exprimée par les CE est aussi un facteur important pour le contrôle du thrombus puisqu'elle permet de convertir la thrombine en enzyme anticoagulante et en enzyme antifibrinolytique grâce à l'action respective de la protéine C et de TAFI (inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine) (267). Ainsi, la coagulation résulte de la balance entre composants pro-thrombotiques (plaquettes activées, facteurs de coagulation) et anti-thrombotiques (fibrinolyse, système anticoagulant) qui contrôlent les dépôts et éliminations de fibrine (267). Une imperfection dans un seul de ces composants peut résulter en saignements ou thromboses et devenir pathologique (268). Une prévalence des événements thrombotiques peut conduire à des AVC ou des attaques cardiaques alors qu'à l'inverse, une trop forte régulation de la coagulation peut conduire à l'hémophilie (267).

### III.2. COAGULATION SANGUINE ET DREPANOCYTOSE

Les patients drépanocytaires sont caractérisés par un état d'hypercoagulabilité à l'état stable (en dehors de toute crise) (255,269-274). Plusieurs études relatent en effet la présence de marqueurs de la coagulation sanguine et de la fibrinolyse en quantités supérieures chez les sujets drépanocytaires comparés à des sujets sains. Ils dénotent une hausse des concentrations des marqueurs de la coagulation sanguine tels que les fragments pro-thrombotiques F1.2 et les complexes thrombine-antithrombine (TAT), de même qu'une hausse de l'activation plaquettaire et des D-dimer, un marqueur plasmatique de la dégradation de la fibrine (168-169,171,255,271-274). Des quantités élevées de microparticules provenant des GR SS, des monocytes et des plaquettes ont par ailleurs été observées chez ces sujets (272,275). Shet et al. ont montré que les microparticules issues des monocytes et des cellules endothéliales de patients drépanocytaires sont porteuses de TF (272). Solovey et al. confirment ces résultats chez l'Homme et chez un modèle de souris transgénique drépanocytaire : l'expression de TF par les CE est augmentée chez les sujets

HbSS comparés aux sujets sains (141,276). Ces microparticules TF<sup>+</sup> semblent impliquées dans la cascade de coagulation puisque corrélées avec des marqueurs pro-thrombotiques (272,275). Enfin, la surexposition de la PS semblerait être impliquée dans la cascade de coagulation : Setty et al. ont rapporté une augmentation des GR PS<sup>+</sup> et des plaquettes PS<sup>+</sup> chez les patients drépanocytaires à l'état stable par rapport à des sujets HbAA. La proportion de GR PS<sup>+</sup> était par ailleurs corrélée à différents marqueurs de la thrombose, ce qui suggère leur implication dans la cascade de coagulation (271) ; sûrement en augmentant la fixation des facteurs pro-thrombotiques sur les membranes (264).

Afin de déterminer l'influence de ce statut d'hypercoagulabilité sur les CVO, les mêmes types d'études ont été menés chez des sujets drépanocytaires en situation de crise comparés à des sujets HbSS à l'état stable et à des sujets sains. Les mêmes différences comparées aux sujets sains ont été observées avec une augmentation des facteurs pro-thrombotiques, de la fibrinolyse et des microparticules tandis que l'activité pro-coagulante est amplifiée par rapport à l'état stable (169,272-273,275). Il semblerait donc que la thrombogenèse puisse être impliquée dans les CVO. Cela va dans le sens des conclusions d'Adedji et al. qui suggèrent que l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) chez les patients drépanocytaires pourrait être initiée par des thromboembolies (277). De même, Ataga et al. ont observé une augmentation des marqueurs pro-thrombotiques chez les patients drépanocytaires atteints d'HTAP (255). Une diminution des protéines S et C, impliquées dans l'inhibition de la coagulation chez les enfants drépanocytaires a par ailleurs été décrite ; cette diminution était associée à un risque d'AVC augmenté (278). Enfin, Tomer et al. ont observé une relation positive entre fréquence des crises douloureuses et activité pro-coagulante des plaquettes (273).

La thrombogenèse pourrait donc jouer un rôle important chez les patients drépanocytaires et pourrait être impliquée dans les états d'hypercoagulabilité observés à l'état stable tout comme dans diverses manifestations pathologiques de la drépanocytose telles que les AVC, l'HTAP ou encore les CVO. Pour conclure, comme le souligne Hebbel, il reste à déterminer si c'est l'activité pro-coagulante qui participe aux CVO ou si elle n'est pas plutôt la conséquence de ces complications vaso-occlusives. Le système pro-coagulant intervenant alors pour réparer les lésions (270).

## IV. MODULATION DU TONUS VASCULAIRE ET STRESS OXYDATIF

### IV.1. MODULATION DU TONUS VASCULAIRE

La modulation du tonus vasculaire permet la diminution ou l'augmentation de la lumière des vaisseaux sanguins, grâce à la contraction ou au relâchement des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). C'est un mécanisme qui permet, entre autre, de :

- ❖ réguler la pression sanguine et donc l'oxygénation tissulaire ;
- ❖ participer à la réaction inflammatoire en permettant la vasodilatation du vaisseaux (147) ;
- ❖ réguler la température centrale de l'organisme (en concentrant le sang dans les organes vitaux grâce à une vasoconstriction des vaisseaux alimentant la peau et les extrémités, ou, au contraire, en augmentant la distribution du sang vers la peau par vasodilatation afin d'évacuer la chaleur lors de hausse de température (279) ;
- ❖ répondre à un effort physique en adaptant la perfusion des diverses zones de l'organisme en fonction des besoins cellulaires et organiques (280-281).

Plusieurs mécanismes permettent le contrôle de ce tonus vasculaire. Parmi eux, le système nerveux autonome : via le système nerveux sympathique, il stimule la contraction des CMLV et donc la vasoconstriction. Ce système agit grâce à la sécrétion de noradrénaline venant se fixer sur les récepteurs adrénergiques  $\alpha$ . En parallèle, une diminution de cette activité sympathique permet la relaxation des vaisseaux (282).

De nombreuses molécules libérées par l'endothélium, et appelées facteurs relaxant (EDRF) ou contractant (EDCF) dérivés de l'endothélium, permettent de contrôler ce tonus vasculaire. Parmi ces molécules, le NO, la prostacycline ( $PGI_2$ , ou prostaglandine  $I_2$ ) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) sont vasodilatateurs. L'ET-1, l'angiotensine II, la prostaglandine  $F_{2\alpha}$  et le thromboxane  $A_2$  sont vasoconstricteurs (283-284). Cependant, les molécules vasomodulatrices les plus puissantes, dont les actions semblent étroitement liées puisque l'une peut avoir un effet inhibiteur sur l'autre et vice versa, sont l'ET-1 et le NO (285-288).

#### IV.1.i. L'ENDOTHELIN-1

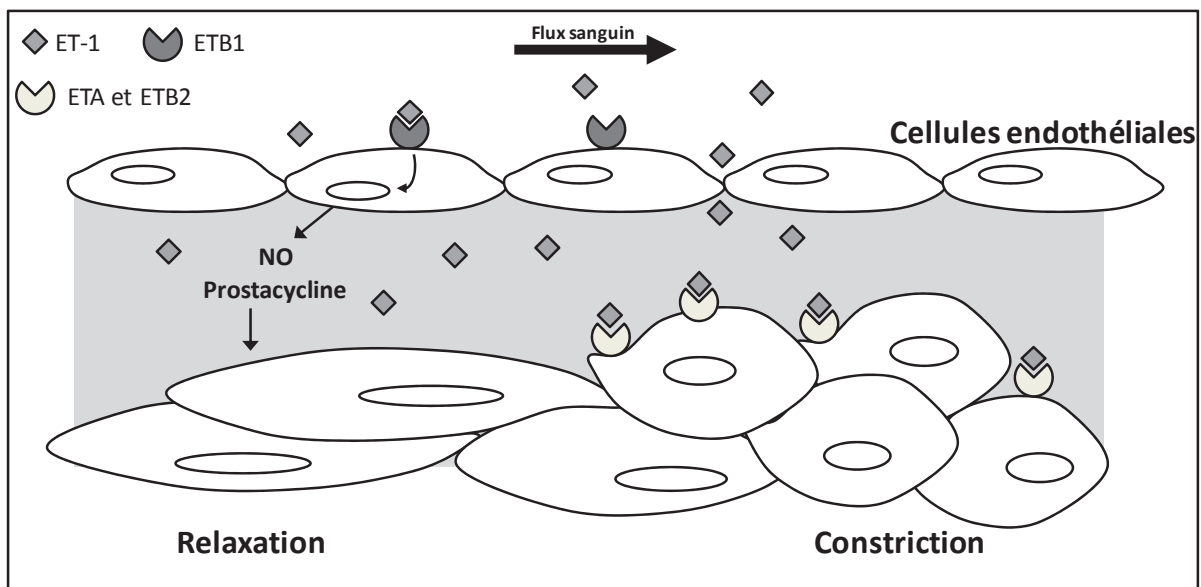
L'endothéline, un des plus puissants vasoconstricteurs identifiés dans l'organisme, a été découvert en 1988 par Yanagisawa et al. (289). Contrairement à d'autres facteurs constricteurs, elle a une action autocrine ou paracrine (290) sur l'ensemble des artères et veines testées (287). Parmi les isoformes de la famille des endothélines (ET-1, ET-2 et ET-3), ET-1 est de loin la plus synthétisée et la plus importante (287). Elle est produite et libérée par une multitude de cellules dont les CE mais aussi par les CMLV, les cardiomyocytes, les leucocytes, les macrophages et plusieurs types de neurones (287-288). Son expression génique peut être activée par la voie NFκB (elle-même stimulée par plusieurs facteurs dont les molécules pro-inflammatoires TNF-α et IL-1β). L'ET-1 participe à la réaction inflammatoire en augmentant la perméabilité cellulaire (291) et en permettant la prolifération des CMLV (287). Elle peut aussi être stimulée par la thrombine, suite à la thrombose, par des endotoxines, l'hypoxie, l'insuline ou encore l'angiotensine II (287-288,290,292). Ses principaux inhibiteurs sont le NO et la prostacycline (287-288). Suite à son expression génique, une prepro-ET-1 est synthétisée puis clivée en big ET-1 qui elle-même est ensuite clivée par l'enzyme de conversion endothéline en ET-1 (287-288,292-293).

C'est la fixation de l'ET-1 sur ses récepteurs ETA et ETB (divisé en ETB1 et ETB2) qui permet son action biologique. La plus importante est une vasoconstriction massive et maintenue dans le temps, dans les gros comme les petits vaisseaux, et qui cause une augmentation de la pression sanguine (287-288,290,292,294). Cependant, il semblerait que la fixation de l'ET-1 sur ses récepteurs produise des réactions opposées et consécutives. En effet, le récepteur ETB1 est préférentiellement exprimé sur les CE ; la fixation de l'ET-1 sur ce récepteur endothélial induit une vasodilatation courte en stimulant la production du NO et de la prostacycline. Suite à cette première action, la liaison de l'ET-1 sur les récepteurs ETA et ETB2 exprimés par les CMLV cause une vasoconstriction plus longue et puissante (288,290,294-295) (figure 15). Ainsi, la réponse à l'ET-1 va dépendre de l'expression des récepteurs ETA, ETB1 et ETB2. Il semblerait que les récepteurs ETA soient les principaux exprimés (en règle générale, plus de 85% des récepteurs à l'ET-1 sont des ETA, les 15% restants étant les ETB) (290). Quant aux vasoconstrictions induites par les récepteurs ETA et ETB2 activés, elles s'expliquent par l'augmentation du niveau intracellulaire d'inositol triphosphates et de diacylglycérol qui permettent la libération du calcium situé dans les



citernes du réticulum sarcoplasmique et donc la contraction musculaire (288,294). Celle-ci se répercute ainsi sur la couche de cellules endothéliales qui va être poussée mécaniquement vers l'intérieur du vaisseau (284).

Enfin, en plus de son action vasoconstrictrice, l'ET-1 est aussi un important médiateur de la prolifération cellulaire en permettant la reconstruction de la néo-intima après les dégâts vasculaires (287). Elle est aussi impliquée dans une grande quantité de processus biologiques tels que les fonctions neurologiques, la physiologie pulmonaire, le transport des fluides et électrolytes, les désordres auto-immuns et les cancers (292). Il a, en effet été observé chez des souris KO pour l'ET-1 des défauts dans la formation du système nerveux, du système cardiovasculaire, du thymus et de la thyroïde ainsi qu'une croissance anormale (296). Ces effets biologiques de l'ET-1 font que cette molécule se trouve impliquée dans diverses pathologies vasculaires et/ou inflammatoires dont l'athérosclérose, l'hypertension artérielle pulmonaire ou les pathologies respiratoires (287,291,293).



**Figure 15 : Régulation du tonus vasculaire par l'ET-1.**

L'ET-1 peut induire, en se liant à l'ETB1, une vasorelaxation courte via la stimulation du NO et de la prostacycline, deux vasodilatateurs tandis que sa fixation sur les récepteurs ETA et ETB2 permet la vasoconstriction en stimulant la contraction des CMLV. Schéma adapté de Masaki et al. (297).

#### IV.1.ii. L'OXYDE NITRIQUE

##### IV.1.ii.a. PRESENTATION DU NO

Le NO est un gaz diatomique connu particulièrement pour son activité vasodilatatrice impliquée dans le maintien de l'homéostasie vasculaire (298-299). Sa petite taille lui permet de diffuser librement à travers les membranes cellulaires (300) où le NO se lie à l'hème fixé à la guanylate cyclase soluble dans le cytosol des CMLV. Celle-ci, une fois liée augmente la concentration intracellulaire en GMPc (Guanosine Mono Phosphate cyclique) qui active alors une protéine kinase dépendante du GMPc. Ces mécanismes aboutissent à une diminution du  $Ca^{2+}$  intracellulaire qui diminue la contraction des CMLV : cette relaxation des muscles lisses permet la dilatation des vaisseaux (298,300-301).

La vasodilatation n'est cependant pas la seule conséquence de la libération du NO puisqu'il intervient dans une multitude d'activités biologiques de l'organisme. Il permet, entre autre, de diminuer l'agrégation plaquettaire, (302), l'adhésion leucocytaire en agissant sur les récepteurs LFA-1 et Mac-1 situés sur les leucocytes (303) ainsi qu'en inhibant le facteur NFκB responsable de l'expression des molécules d'adhérence vasculaire (202). Il pourrait ainsi avoir une action anti-inflammatoire à forte concentration (304). Il a aussi été montré que le NO pourrait agir comme un neurotransmetteur (305), moduler certaines activations géniques et enzymatiques et moduler l'apoptose et l'angiogenèse via, entre autre, la stimulation de la prolifération des CMLV (299,301).

L'expression du NO se fait via les NO synthases, des enzymes présentant trois isoformes : la NOS endothéliale (eNOS), neuronale (nNOS) et inducible (iNOS). La eNOS et nNOS ont la particularité d'être exprimées constitutivement et respectivement au niveau des CE et des tissus neuronaux. Leur expression est régulée par le complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline (301,306). A noter tout de même que la eNOS réagit aux augmentations de contraintes de cisaillement qui vont causer sa phosphorylation et la rendre plus sensible au  $Ca^{2+}$  (306). La synthèse de la NO au niveau du lit vasculaire a été attribuée exclusivement à la eNOS (307). La iNOS quant à elle est activée suite à un stimulus, comme l'infection bactérienne où les dégâts cellulaires (306,308), au niveau d'une multitude de cellules telles que les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques, les CE ou encore les cellules épithéliales (304) et n'est pas dépendante du  $Ca^{2+}$ . Le substrat des NOS est la L-arginine. En présence d'une multitude de cofacteurs dont NADPH, FAD, l'hème, la tétrahydrobioptérine

(BH4) et le Ca<sup>2+</sup>/calmoduline (sauf pour iNOS), ces enzymes catalysent le clivage de la partie azotée de la L-arginine, ce qui donne le NO et de la L-citrulline (298,301).

#### IV.1.ii.b. DIMINUTION DE LA BIODISPONIBILITE DU NO

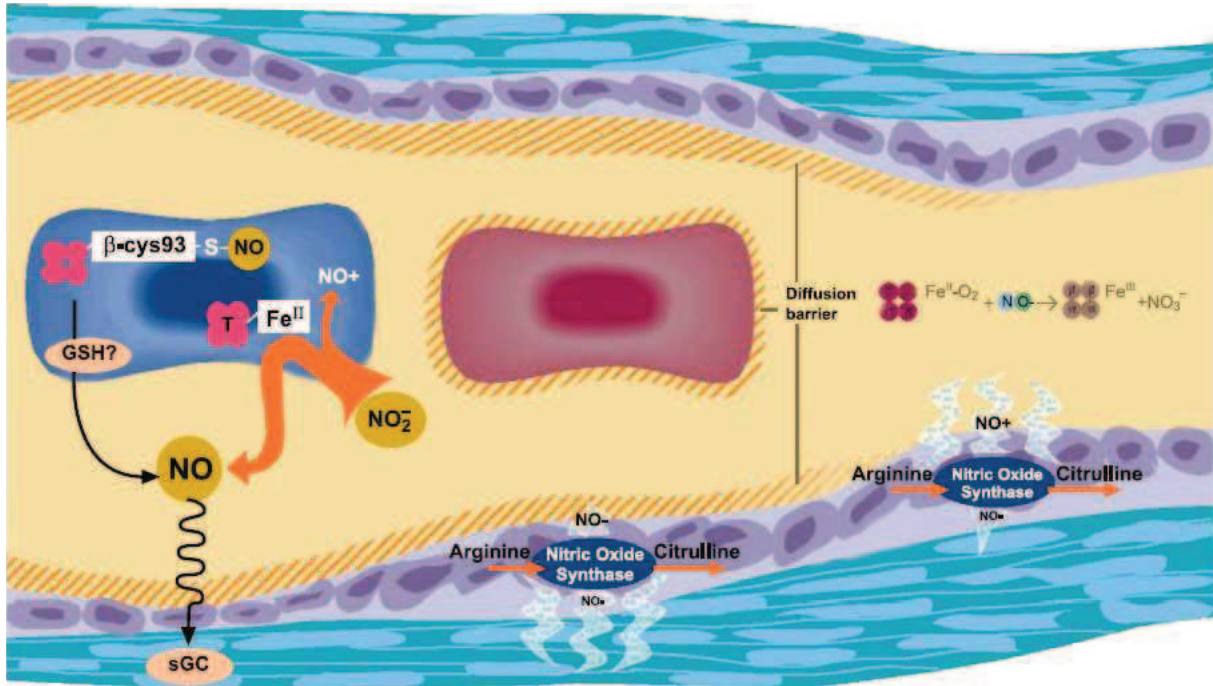
La baisse de la biodisponibilité du NO fait appel aux différents mécanismes physiologiques qui inhibent directement le NO soit qui limitent sa production. Quelque soit le mécanisme, il en résulte une diminution de l'action biologique première du NO, à savoir la vasodilatation. Cela peut dans certains cas intervenir dans des pathologies vasculaires et inflammatoires telles que l'hypertension artérielle pulmonaire, le diabète, l'athérosclérose ou encore la drépanocytose (298).

❖ Hémoglobine et NO : la réaction entre le fer contenu dans l'hème de l'oxyHb et le NO est la voie la plus importante de diminution de la biodisponibilité du NO puisqu'il est converti en nitrate qui sera éliminé par les reins (299) (figure 16, droite). Elle implique néanmoins que l'Hb ne soit plus contenue par la membrane des GR, qui constitue une barrière entre l'Hb et le plasma et la rend 6000 fois moins accessible au NO (figure 16, centre). Ainsi, en situation d'hémolyse, l'Hb plasmatique peut absorber tout le NO disponible et causer d'importants dysfonctionnements dans la régulation du tonus vasculaire (299) (figure 16, droite). En contrepartie, cela permet une action antioxydante car en se liant au fer, le NO forme un produit stable qui empêche l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de se lier au fer et de produire de puissants ROS très cytotoxiques (298).

❖ Découplage des NOS : comme pour tous les enzymes, les substrats agissent comme des molécules limitantes et en leur absence, l'enzyme ne peut catalyser la formation des produits. Pour les NOS, l'absence des substrats tels que la L-arginine, la BH4 ou encore l'oxygène induit un découplage de l'enzyme, qui va alors non plus produire du NO mais des ROS dont l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, un puissant agent vasoconstricteur et neurotoxique (301,306). Cela induit donc une diminution des concentrations en NO ainsi que des effets contraires à ceux du vasodilatateur azoté. La diminution de la disponibilité de la L-arginine peut provenir de son utilisation pour la production d'urée (301). Elle peut aussi être due à l'hémolyse qui provoque la libération d'arginase, une enzyme entrant en compétition avec les NOS pour l'utilisation de la L-arginine (86). Certains ROS (peroxynitrite : OHOO-) peuvent aussi

conduire à diminuer les concentrations en BH4 en les oxydant, ce qui participe au découplage des NOS (309).

❖ Action cytotoxique du NO et stress-oxydatif : le stress-oxydatif est aussi une importante voie de diminution de la biodisponibilité du NO car l' $O_2^{\bullet-}$  réagit directement avec le NO, ce qui l'inactive et forme le peroxynitrite, un ROS extrêmement cytotoxique (300).



**Figure 16 : Modélisation de la régulation de la biodisponibilité du NO par l'hémoglobine et ses effets vasodilatateurs.**

**Au centre :** le NO est produit par les NOS afin de permettre la relaxation des CMLV et comme l'Hb est maintenue par la membrane de GR à l'intérieur de la cellule, la biodisponibilité du NO n'est pas altérée. **A droite :** suite à l'hémolyse intravasculaire, le relargage de l'Hb et de l'hème libre dans le lit vasculaire induit une forte diminution de la biodisponibilité du NO qui se retrouve piégé par le fer de l'Hb et converti en nitrate et metHb. **A gauche :** 1) le nitrate, lors de la désoxygénation des GR peut être converti en NO et participer à la dilatation vasculaire ; 2) la formation de SNO-Hb en situation d'oxygénation va permettre le relargage de NO, lorsqu'il y a désoxygénation de l'Hb, afin qu'il permette la vasodilatation. Schéma tiré de Gladwin et al. (299).

#### IV.1.ii.c. INTERVENTION DES GR DANS LA PRODUCTION DU NO

Cette partie décrit de récentes découvertes sur les mécanismes de régulation du NO qui illustrent le rôle prépondérant des GR dans la modulation de la biodisponibilité du NO.

❖ La voie du nitrite/nitrate : afin de contrebalancer les fortes pertes en NO, piégé par différentes réactions, un mécanisme a récemment été observé faisant intervenir les nitrates/nitrites ingérés dans l'alimentation. Le nitrate pourrait être transformé en nitrite

au niveau salivaire par des bactéries ayant une activité de nitrate réductase. Le nitrite, en passant dans la circulation sanguine pourrait alors permettre de produire rapidement du NO à la demande et indépendamment des NOS (301). En effet, le nitrite, qui est une molécule réagissant 10 000 fois moins que le NO avec le fer, peut, en se liant à la désoxyhémoglobine au niveau des GR, être converti en NO (299,310) (figure 16, gauche). Ainsi, ce mécanisme réagirait comme un senseur de l'oxygénation tissulaire en détectant les variations de saturation de l'Hb et réagissant en formant ou non du NO pour dilater les vaisseaux (299,310). De plus, le nitrate non converti en nitrite et non éliminé par les reins ainsi que celui issue de la dégradation du NO peuvent être recyclés en étant réabsorbés au niveau des glandes salivaires et retourner dans la salive afin de répéter le cycle (301).

❖ La voie de la SNO-Hb : Ce nouveau modèle suggère que, lors de fortes expositions des GR à du NO, le NO pourrait pénétrer dans les GR et y être piégé en se liant à la faible population d'hème encore désoxygéné dans des GR oxygénés afin de former un complexe fer-NO-Hb (299). Le NO serait alors transféré à un résidu cystéine de la  $\beta$ -globine afin de former la SNO-Hb (Hb-S-nitrosée) (figure 16, gauche). La particularité de cette SNO-Hb est qu'en situation de désoxygénation des GR, par exemple en hypoxie, la SNO-Hb va libérer le NO dans le lit vasculaire afin qu'il puisse participer à la relaxation vasculaire (311). Ce mécanisme supporte l'existence de NO stabilisé qui n'est pas susceptible d'être rapidement consommé et qui peut être reconverti en NO lorsque cela est nécessaire (299).

❖ GR et NOS : il semblerait que les GR disposent d'une isoforme des NOS, très proche de la eNOS, qui permettrait aux GR de convertir la L-arginine en NO et L-citrulline, et interviendrait dans la modulation du tonus vasculaire, le contrôle de la déformabilité de la membrane érythrocytaire (en l'améliorant) et dans l'hémostase plaquettaire (en inhibant l'agrégation plaquettaire) (307,312-313).

#### **IV.2. STRESS OXYDATIF ET DEFENSES ANTIOXYDANTES**

Le stress oxydatif est le résultat de la balance entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les défenses antioxydantes. Si les deux sont équilibrés, ces deux versants du stress-oxydatif permettent aux processus physiologiques de fonctionner normalement. En revanche, si la balance penche dans le sens d'une surproduction de ROS

et/ou une diminution des défenses antioxydantes, le stress oxydatif devient délétère pour l'organisme en causant des détériorations cellulaires (314).

Dans un environnement physiologique normal, les ROS jouent un rôle crucial dans la signalisation cellulaire, l'inflammation (stimulation de NFκB) ainsi que les défenses immunitaires (en participant à la destruction des organismes étrangers) (315). Les défenses antioxydantes permettant alors de maintenir l'effet des ROS à des rôles physiologiques.

#### IV.2.i. UNE PRODUCTION DE ROS DELETERE POUR L'ORGANISME

La production excessive de ROS, et/ou des mécanismes de défense antioxydante inadaptés peuvent conduire à des situations pathologiques de types cardiovasculaires, neurovasculaires, dégénératives, diabète, cancers ou encore drépanocytose (70,315-317).

Les ROS se définissent comme des molécules qui contiennent un seul ou un nombre impair d'électrons sur leur orbite atomique ou moléculaire (315). Ils incluent les radicaux libres que sont l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ), le radical lipidique ( $ROO^{\bullet}$ ) et le NO. Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), et le peroxinitrite, qui ne sont pas des radicaux libres mais bien des ROS, contribuent aussi fortement à l'oxydation en provoquant des dégâts cellulaires (288,315).

L'anion superoxyde est produit par de multiples processus comprenant des systèmes non enzymatiques (phagocytose, bactériolyse, agrégation cellulaire pendant l'inflammation) et surtout des systèmes enzymatiques, essentiellement au niveau des CE et CMLV (288) (figure 17):

- ❖ les complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale : en règle générale, une fuite de 2 à 5% d'électrons s'effectue au niveau de ces complexes pendant les phosphorylations oxydatives et conduit à la production d' $O_2^{\bullet-}$ . En augmentant la resynthèse d'ATP (Adénosine triphosphate), l'exercice physique est le principal producteur de ROS dans la mitochondrie (318). Suite à des perturbations métaboliques (hypoglycémie, hypoxie, ischémie-reperfusion), cette fuite d'électrons peut être plus importante et amplifier la production d' $O_2^{\bullet-}$ . Cette production d'anions superoxydes au niveau des mitochondries peut aussi être stimulée par la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  (309,315) ;

- ❖ NADH/NADPH oxydase : présente au niveau membranaire, cette enzyme catalyse la réduction de l'oxygène en utilisant le NADH et NADPH comme donneur d'électron

et produit des anions superoxydes (319). Présente chez les cellules phagocytaires où elle permet la défense contre les microorganismes étrangers ainsi qu'au niveau des CE et CMLV, elle peut être régulée par de nombreux facteurs comme des cytokines, l'angiotensine II ou des forces hémodynamique (320). Par exemple, des contraintes de cisaillement turbulentes ou la cytokine TNF- $\alpha$  peuvent stimuler l'enzyme et la production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (314-315) ;

- ❖ la xanthine oxydase (XO) : afin de catalyser la transformation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique, la XO utilise l'oxygène qui devient de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (315). Cette production de ROS est minime en conditions physiologiques. Cependant, suite à un stress tels que la cytokine TNF- $\alpha$  ou encore une ischémie/reperfusion, il a été montré que la XO peut devenir une source majeure d'anions superoxydes (314) ;

- ❖ le découplage des NOS, comme décrit dans le chapitre précédent, conduit à la production de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> suite à une diminution de ses substrats tels que la L-arginine ou le BH4 (301).

Ainsi, une fois la production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> exacerbée par divers stimuli, celui-ci réagit avec la superoxyde dismutase (SOD) qui est une enzyme antioxydante catalysant la formation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> va aussi réagir avec le NO, lorsque celui-ci est présent en grande quantité, ce qui va conduire à la diminution de la biodisponibilité du NO ainsi qu'à la formation de peroxy-nitrite (figure 17).

En parallèle, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut être soit réduit en eau et en O<sub>2</sub> par les enzymes antioxydantes glutathion peroxydase (GPx) et catalase, soit être converti en radical hydroxyle OH<sup>•</sup> en présence de fer sous forme réduit (Fe<sup>++</sup>) via la réaction de Fenton :

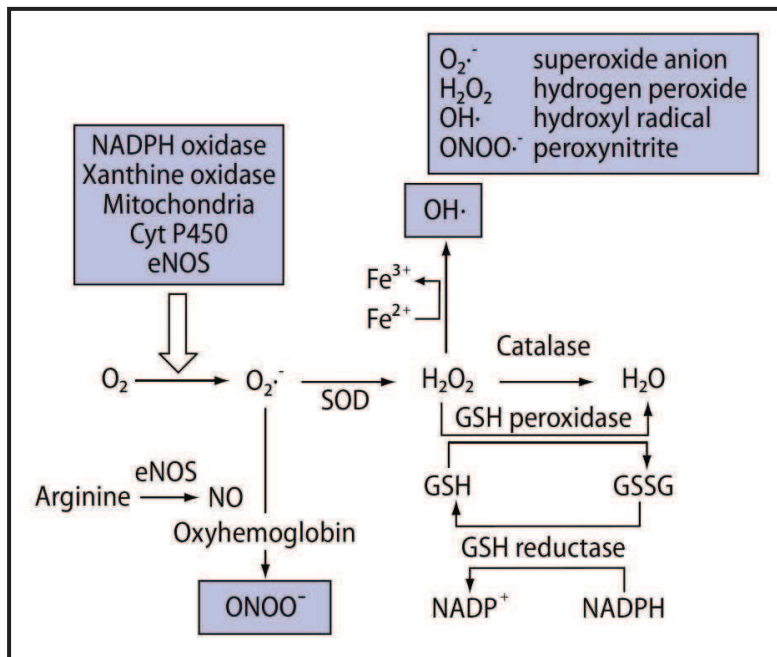


Ce radical hydroxyle est le ROS le plus réactif et agressif. En conséquence, sa distance de diffusion ne peut excéder le diamètre d'une protéine par comparaison au peroxy-nitrite qui réagit sur une distance de deux cellules (309).

Que ce soit le radical peroxy-nitrite ou l'OH<sup>•</sup>, ils participent tous deux aux peroxydations des lipides, des protéines et de l'ADN ce qui peut réduire la fonctionnalité de ces molécules (288,316). Les peroxydations lipidiques causent un dysfonctionnement des membranes cellulaires censées offrir un transport sélectif aux cellules : les lipides insaturés sont convertis en lipides hydroperoxyde polarisés ce qui augmente la fluidité membranaire, les efflux des solutés cytosoliques et induit une perte d'activité des protéines membranaires (316). De plus, ces ROS sont impliqués dans la perméabilisation de la



membrane mitochondriale ce qui conduit à une apoptose cellulaire car la mitochondrie contient des facteurs pro-apoptotiques qui, une fois dans le cytosol déclenchent la mort programmée de la cellule (309,315).



**Figure 17 : Système oxydant enzymatique et non-enzymatique.**

L' $O_2^{\bullet-}$  produit à partir de multiples facteurs (NADPH oxydase, XO, chaîne respiratoire mitochondriale, eNOS découplée) est soit converti en peroxyde d'azote en réagissant avec le NO et cause des dégâts cellulaires, soit pris en charge par l'enzyme antioxydante SOD pour former de l' $H_2O_2$ . Cette  $H_2O_2$  va alors soit être inactivée en eau par les systèmes antioxydants catalase et glutathion peroxydase (GPx) soit être transformé en  $OH^{\bullet}$  et causer, comme le peroxyde d'azote, des dysfonctionnements cellulaires. Schéma emprunté à Huet et al. (309).

#### IV.2.ii. STRESS OXYDATIF, ADHERENCE VASCULAIRE ET MODULATION DU TONUS VASCULAIRE

Le stress oxydatif semble jouer un rôle important dans les mécanismes inflammatoires en induisant la stimulation de NF $\kappa$ B, ce qui induit, entre autre, une augmentation des concentrations en molécules d'adhérence vasculaire et donc favorise les mécanismes d'adhésion leucocytaire et érythrocytaire (70). Ainsi, une expression de ROS anormale peut conduire à un dysfonctionnement endothélial en augmentant les possibilités, pour les cellules sanguines, d'adhérer à l'endothélium.

Du point de vue de la modulation du tonus vasculaire, NF $\kappa$ B est aussi responsable de la synthèse d'ET-1 (292) si bien que l'augmentation des concentrations en ROS favorise la vasoconstriction, en augmentant d'une part les concentrations en ET-1 (321) et d'autre part en diminuant la biodisponibilité du NO (300). En parallèle, l'ET-1 semble être impliquée dans la formation d' $O_2^{\bullet-}$  en se liant à son récepteur ETA, ce qui stimulerait la production de ROS via la NADPH oxydase (322).



### **IV.3. DRÉPANOCYTOSE, MODULATION DU TONUS VASCULAIRE ET PRODUCTION DE ROS ANORMALE**

La drépanocytose est caractérisée par des épisodes d'ischémie/reperfusion récurrents. Ces épisodes sont susceptibles de provoquer une augmentation du stress oxydatif et une modulation anormale du tonus vasculaire. Les ROS apparaissent ainsi comme des médiateurs possibles des CVO.

#### **IV.3.i. VASOCONSTRICTION EXACERBÉE**

L'implication de l'ET-1 dans la physiopathologie de la drépanocytose semble acquise bien que les mécanismes d'actions soient encore discutés. De fortes concentrations d'ET-1 circulante ont en effet été observées chez les patients drépanocytaires à l'état stable ou en crise comparés à des sujets sains (197,323-327). Ces concentrations sont exacerbées en situation de crise puis diminuent légèrement dans les semaines qui suivent tout en restant supérieures aux valeurs de repos (197,325-327). Chez des souris drépanocytaires (SAD), un stress d'H/R cause une diminution de la vélocité du flux sanguin dans l'artère rénale, suggérant d'importantes vasoconstrictions aggravant les blocages sanguins. Sabaa et al. ont récemment montré que l'utilisation du Bosentan, un antagoniste non spécifique des récepteurs à l'ET-1, aboutissait à une restauration du flux sanguin, suggérant ainsi un rôle important de l'endothéline dans la physiopathologie drépanocytaire (109).

Afin de comprendre la relation entre ET-1 et drépanocytose, des études ont été réalisées sur culture de cellules endothéliales vasculaires. La mise en contact des CE avec des GR SS désoxygénés, donc falciformes, induit l'expression d'ARNm codant pour l'ET-1 ainsi que du peptide lui-même (327-328) et est associée à une augmentation de la contraction de l'anneau aortique (327). Il a d'autre part été montré qu'un flux de type veineux ( $1 \text{ dyn/cm}^2$ ) de GR SS oxygénés sur une culture de CE était associé à la sécrétion d'ET-1 (329). Ces deux études suggèrent qu'un facteur présent dans le plasma et induit par les GR SS pourrait être à l'origine de l'expression de l'ET-1 (326,328). Le facteur de croissance placentaire (PIGF), secrété en abondance par les cellules érythroïdes chez les patients drépanocytaires et qui est relié à la sévérité de la maladie (330), pourrait être ce responsable (331).

Enfin, plusieurs études se positionnent sur une intervention du NO dans le contrôle de l'ET-1 et de ses effets (109,327-328). L'induction de NO par des cultures de CE induit une diminution de la production d'ET-1 (328,332-333). La biodisponibilité du NO étant altérée

chez les patients drépanocytaires (109,256,327,334) (cf. chapitre suivant), l'inhibition par le NO de l'ET-1 pourrait être levée et conduire donc à des effets délétères de l'ET-1 qui sont susceptibles de participer aux CVO (109). A noter qu'en plus d'être fortement vasoconstrictrice, l'ET-1 peut être problématique pour les sujets drépanocytaires car elle peut stimuler les canaux Gardos, responsables de la déshydratation cellulaire, ce qui facilite la falciformation érythrocytaire (65-67).

#### IV.3.ii. REDUCTION DE LA BIODISPONIBILITE DU NO

L'action fortement vasodilatatrice du NO pourrait présenter un intérêt majeur chez les patients drépanocytaires en intervenant positivement sur les mécanismes d'occlusion vasculaire. Cependant, de multiples facteurs, très présents chez ces sujets, sont impliqués dans une baisse de la biodisponibilité du NO et pourraient participer à l'amplification des mécanismes pro-occlusifs (figure 18).

Le dosage des métabolites nitrite/nitrate (NOx) dans le plasma, qui rend compte de la quantité de NO ayant eu une action biologique sur la fonction endothéliale (335-336), permet d'évaluer la biodisponibilité du NO. Aussi bien à l'état stable que durant une CVO, il a ainsi été observé que les NOx étaient diminués chez les patients drépanocytaires (256,337) et les souris transgéniques drépanocytaires (132,140,338-339). Les niveaux de NOx apparaissent au plus bas suite à des syndromes thoraciques aigus comparés à des CVO, qui présentent elles-mêmes des niveaux plasmatiques en NOx inférieurs à ceux des sujets à l'état stable (256,337). Enfin, une faible quantité de NOx détectée chez des sujets drépanocytaires pendant une CVO a été mise en relation avec de fortes douleurs (340). Ainsi, de faibles concentrations en NO plasmatique semblent pouvoir jouer un rôle dans l'installation des CVO.

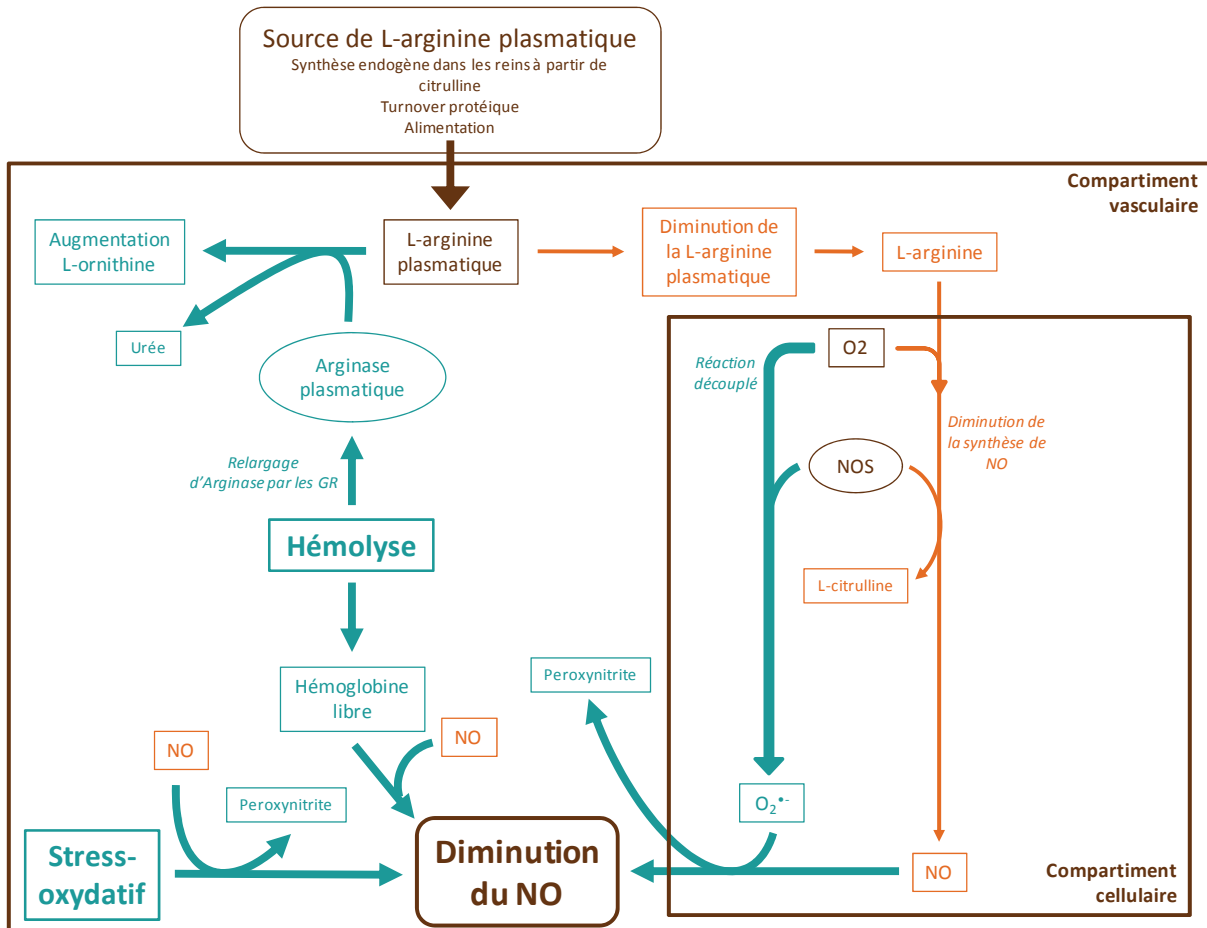
Ces faibles quantités de NOx détectées chez les patients drépanocytaires semblent traduire une faible production de NO par des NOS découplées et son inhibition par le stress oxydatif ou par l'Hb libérée du fait d'hémolyse intravasculaire (85) (figure 18).

Plusieurs indicateurs démontrent que les NOS pourraient être découplées dans le cadre de la drépanocytose. Il a tout d'abord été observé que l'ARNm codant pour les arginases I et II était augmenté chez les souris SAD atteintes de péritonite (132) ; de plus, une plus importante activité de cette protéine a été détectée chez les patients

drépanocytaires (341). Morris et al. ont aussi rapporté que l'activité de l'arginase était positivement corrélée à différents marqueurs de l'hémolyse (Hb libre et lactate déshydrogénase -LDH) et qu'une baisse de la biodisponibilité de la L-arginine pour les NOS était corrélée avec une augmentation de la mortalité chez les sujets drépanocytaires de l'étude (341). En parallèle, les concentrations en L-arginine, substrat des NOS pour former du NO, sont diminuées chez les patients drépanocytaires (337,341). Ainsi, l'importante hémolyse caractéristique de la drépanocytose induirait une libération accrue d'arginase, consommatrice de L-arginine initialement destinée aux NOS pour produire du NO. Ce découplage des NOS semblant conduire à une production accrue d'anions superoxydes diminuerait d'autant plus la biodisponibilité du NO (341) (figure 18). En parallèle, des diminutions de l'activité et de l'expression des NOS ont été observées par Bartolucci et al. chez des souris SAD atteinte d'une inflammation, ce qui suggère un dysfonctionnement dans la régulation des NOS suite à une inflammation chez les souris transgéniques drépanocytaires (132).

De plus, du fait de l'hémolyse, les concentrations d'Hb libre plasmatiques sont plus importantes chez les patients (342) et souris drépanocytaires (338) et sont positivement corrélées à une consommation anormale du NO par le plasma drépanocytaire (339,342) (figure 18).

Enfin, le stress oxydatif est le troisième mécanisme participant à la consommation anormale du NO (figure 18). Les patients drépanocytaires et souris transgéniques drépanocytaires présentent une importante production de ROS (140,338,343-344) (cf. chapitre suivant). Les phénomènes d'H/R récurrents ainsi que le découplage des NOS chez ces sujets participent à l'augmentation de l' $O_2^{\bullet-}$  (338,343-344). La production de peroxydite associée à la consommation du NO par l' $O_2^{\bullet-}$  est ainsi augmentée dans le cas de la drépanocytose, comme en attestent les concentrations de nitrotyrosine, un marqueur de cette molécule, chez les souris transgéniques drépanocytaires suite à un stress d'H/R (344) ou à l'état stable (338,344). De plus, chez des souris transgéniques drépanocytaires, la biodisponibilité du NO est inversement corrélée aux peroxydations lipidiques (339). Ces résultats soulignent l'importance du NO dans la production de ROS (140,339) et inversement, les conséquences d'une augmentation de ROS sur la diminution de la biodisponibilité du NO (338,344).



**Figure 18 : Diminution de la biodisponibilité du NO chez les patients drépanocytaires.**

Les mécanismes altérés chez les sujets drépanocytaires sont représentés en orange. En bleu apparaissent les mécanismes prépondérants chez les drépanocytaires. Deux facteurs initient la diminution du NO : l'hémolyse et le stress oxydatif. L'hémolyse agit sur la capture du NO via l'Hb libérée dans le plasma et la libération d'arginase qui provoque le découplage des NOS par raréfaction de son substrat. Le stress oxydatif agit en consommant le NO par l'anion superoxyde issu soit des NOS découplés soit d'une balance anormale entre production de ROS excédentaires et enzymes antioxydantes diminuées. Figure adaptée et traduite de Morris et al. (341).

Ces diminutions de la biodisponibilité du NO participent aux dysfonctionnements vasculaires conduisant aux CVO et syndrome thoracique aigu en limitant fortement les dilatations vasculaires nécessaires à l'ajustement de la pression sanguine et en favorisant les constriction via la levée de l'inhibition de l'ET-1 (cf. partie 2.IV.3.i ; p80).

Belhassen et al. ont observé que la réponse de l'endothélium à l'augmentation des contraintes de cisaillement est altérée chez des patients drépanocytaires à l'état stable. Cela pourrait s'expliquer par un dysfonctionnement du métabolisme du NO (345). De plus, l'injection de sodium nitroprusside (SNP), un donneur de NO, à des sujets drépanocytaires à l'état stable rétablit une vasodilatation normale de l'artère brachiale (257,345). Ces résultats suggèrent que les patients drépanocytaires présentent une bonne sensibilité au NO, mais que la stimulation de sa production par les contraintes de cisaillement pourrait être

altérée (345). En revanche, Kaul et al. ont observé chez deux modèles de souris drépanocytaires (BERK et S+S-Antilles) qu'au niveau d'artérioles du muscle crémaster, la réponse à l'injection de SNP était fortement limitée chez ces souris par rapport à des souris saines (334,338). Ces auteurs concluent que la sur-stimulation du système NOS/NO chez ces souris drépanocytaires suite aux fréquents épisodes d'H/R peut conduire à réduire la réponse vasodilatatrice du NO.

Afin de contrer cette baisse de la biodisponibilité du NO, plusieurs études ont été menées sur l'effet positif de l'inhalation de NO. Celle-ci semblerait réduire les douleurs et la durée d'hospitalisation chez les sujets drépanocytaires en CVO (346). Il a de plus été montré chez les souris transgéniques drépanocytaires SAD que l'inhalation du NO améliorait la survie (133) et réduisait les dégâts pulmonaire (134) des souris suite à un stress vaso-occlusif.

#### IV.3.iii. STRESS-OXYDATIF AMPLIFIÉ

Le stress-oxydatif exacerbé observé chez les sujets drépanocytaires est un point important dans le développement de la physiopathologie drépanocytaire. Les ROS sont impliqués dans la falciformation des GR, l'adhérence vasculaire, la modulation du tonus vasculaire et l'inflammation, soit tous les mécanismes contribuant aux CVO.

Des augmentations du stress oxydatif suggérant une surproduction radicalaire ont été décrites chez des adultes, enfants ou souris transgéniques drépanocytaires et ce, aussi bien au niveau plasmatiques que des GR, leucocytes ou plaquettes (138-140,145,165,339,343,347-353). L'état des défenses antioxydantes enzymatiques et totale (défenses antioxydantes enzymatique et non-enzymatiques : Vitamine C et E, GSH) fait moins consensus (349,351-352) bien qu'il semble que ces mécanismes soient altérés chez les sujets drépanocytaires (140,242,339,348-349,351) (tableau 3). Ainsi, il semblerait y avoir un dysfonctionnement dans la balance oxydative chez les patients drépanocytaires et les causes et conséquences seront discutées dans les chapitres qui suivent.

**IV.3.iii.a. FACTEURS STIMULANT LA PRODUCTION DE ROS CHEZ LES PATIENTS  
DREPANOCYTAIRES**

La surproduction de ROS chez les sujets drépanocytaires est multifactorielle et peut s'expliquer par :

❖ l'hémolyse accrue, ce qui conduit à une augmentation de l'hème libre qui est fortement impliqué dans la production de ROS (86) ;

❖ le découplage des NOS suite à la consommation de ses substrats : la L-arginine par l'arginase libérée lors de l'hémolyse et le BH4 par le peroxynitrite, ce qui conduit à la production d' $O_2^{\bullet-}$  (317,341) ;

❖ une augmentation de la formation de peroxynitrite lorsque le NO réagit avec l' $O_2^{\bullet-}$  (140,339) ;

❖ la production de ROS par des leucocytes activés suite à l'exposition à l'hème libre issu de l'hémolyse (86,354) ;

❖ les GR porteur d'HbS qui ont une production intra-érythrocytaire des ROS 1,7 fois supérieure à celle des GR « normaux » (69,355) ;

❖ une augmentation de l'H/R, exacerbée par l'adhésion cellulaire à l'endothélium, qui va stimuler la production de ROS (139,237,347) via entre autre la xanthine oxydase qui est suractivée lors d'H/R (139,344). Cette XO pourrait provenir des cellules hépatiques qui vont, suite à un stress d'H/R, la libérer dans la circulation. La XO circulante va alors se lier aux CE afin de participer à la réduction de l'hypoxanthine et produire des ROS (343).

❖ la NADPH oxydase : alors que chez des souris  $\beta^S$ , l'adhésion cellulaire est augmentée, des souris  $\beta^S$  et déficientes en NADPH oxydase restaurent une adhérence normale. Cela suggère que la NADPH oxydase, qui est exprimée par les leucocytes activés et les CE, en produisant des ROS, pourrait favoriser l'adhérence cellulaire (84,356).

Nom	Espèce	Tissus	Conditions	Production de ROS						Défense antioxydante						
				O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	OH <sup>*</sup>	ONOO <sup>-</sup>	XO	SOD	Cat	GPX	GSH				
<b>Dasgupta et al. 2006</b> (140)	S	Muscle, Rein, Foie	CB				↗			↗	↗	↗				
<b>Dasgupta et al. 2010</b> (339)		Muscle, Rein, Foie						↗			↗	↗	↗			
<b>Nath et al. 2000</b> (145)		Plasma et Aorte														
<b>Nath et al. 2001</b> (350)		Rein														
<b>Pritchard et al. 2004</b> (344)		Poumon	CB et H/R						↗							
<b>Kaul et al. 2000</b> (138)		Paroi vasculaire	H/R		↗											
<b>Kaul et al. 2004</b> (237)		Paroi vasculaire			↗											
<b>Osarogiagbon et al. 2000</b> (139)		Plasma, gaz expiré, foie/ rein respectivement														
<b>Amer et al. 2006</b> (353)		GR, Pl, Neutro.			↗ de la production de ROS générale											
<b>Akohoue et al. 2007</b> (165)		Urine			↗ de la production de ROS générale											
<b>Fasola et al. 2007</b> (242)	Sérum															
<b>Rusanova et al. 2010</b> (349)	Plasma															
<b>Aslan et al. 2001</b> (343)	GR	CB														
<b>Hebbel et al. 1982</b> (69)	GR															
<b>Manfredini et al. 2008</b> (352)	GR															
<b>Das et al. 1980</b> (351)	GR															
<b>Emokpae et al. 2010</b> (348)	Sérum															
				*												

**Tableau 4 : Stress oxydatif chez les patients drépanocytaires et les souris transgéniques drépanocytaires.**

Les variations sont observées en comparaison avec des sujets sains HbAA ou des souris contrôles C57Bl/6. ONOO<sup>-</sup> : peroxynitrite ; S : souris transgéniques drépanocytaires, H : patient drépanocytaire ; Pl : plaquette ; Neutro : neutrophile ; CB : condition basale/état stable ; H/R : hypoxie/réoxygénation ; \* : chez drépanocytaires atteints d'une maladie rénale chronique vs. à l'état stable.

#### IV.3.iii.b. CONSEQUENCES D'UNE AUGMENTATION DU STRESS OXYDATIF CHEZ LES PATIENTS DREPANOCYTAIRES

L'augmentation des marqueurs du stress oxydatif (349) et la diminution des défenses antioxydantes (242) semblent respectivement liés à un nombre de crises douloureuses plus important et à une augmentation de la sévérité de la maladie chez les patients drépanocytaires. Ainsi, les dommages organiques chroniques dont sont sujets les patients drépanocytaires, et cela en dehors des épisodes de CVO, pourraient être la conséquence des altérations de la balance oxydative pouvant endommager les organes (139,348). Ces altérations organiques pourraient être le fruit, entre autre, des oxydations lipidiques et protéiques occasionnées par les ROS.

Au niveau cellulaire, les ROS en excès participent de manière importante à la diminution de la biodisponibilité du NO (cf. chapitre précédent). De même qu'il a été observé que le stress oxydatif pourrait stimuler l'activation des canaux K/Cl au niveau de la membrane de GR SS chez les souris SAD (68). Cela aurait pour conséquence de stimuler la déshydratation cellulaire qui est impliquée dans l'hémolyse en facilitant la falciformation des GR (357).

Enfin, les ROS exercent une action importante dans la stimulation de l'adhésion leucocytaire et érythrocytaire à l'endothélium via la stimulation de la voie de transduction de NFκB (238). Il a été observé *in vitro* et chez des souris transgéniques drépanocytaires *in vivo* et *ex vivo* que les zones d'adhésion cellulaire étaient caractérisées par un stress oxydatif accru (138,237-238,347). Cette adhérence érythrocytaire et leucocytaire est en revanche fortement limitée par l'action de la catalase (237,347). Ainsi, ces résultats démontrent un lien direct entre adhérence vasculaire et ROS (237,347).

### V. SYNTHÈSE DES ÉLÉMENTS IMPLIQUÉS DANS LA VASO-OCCLUSION

Cette partie bibliographique a permis de mettre en exergue les dysfonctionnements vasculaires/endothéliaux observés chez les patients drépanocytaires aussi bien à l'état stable qu'en situation de crise. Cet « état stable », entre les crises, ne s'apparente cependant pas à des valeurs « normales », et souligne la fragilité de cette situation chez ces patients (186). Ces résultats soulignent aussi la possibilité qu'entre les crises, les organes puissent tout de



même subir des dommages moins intenses que lors des CVO, mais tout aussi problématiques de par leur chronicité. Ces altérations organiques aboutissent notamment à une prévalence élevée d'HTAP (23%) et de microalbuminurie (10%) chez des sujets drépanocytaires n'ayant pas été sujets à des crises douloureuses depuis plusieurs années (95). L'« état stable » chez les patients drépanocytaires se caractérise par des concentrations anormales en cytokines pro-inflammatoires (186), en molécules solubles d'adhérence vasculaire (254), par un état d'hypercoagulabilité (272-273), par un stress oxydatif accru et par une expression anormale de l'ET-1 (323). Ce fragile état stable peut donc déboucher sur des occlusions vasculaires ou crises douloureuses suite à des modifications environnementales conduisant à la falciformation érythrocytaire (hypoxie, exercice aigu, forte température, déshydratation...) ou à exacerber l'inflammation (infections). Les crises sont alors mises en place du fait de l'intervention de multiples mécanismes s'amplifiant les uns les autres jusqu'à aboutir à une occlusion vasculaire.

La figure 19 permet de se rendre compte des diverses interactions participant à la diminution de la lumière des vaisseaux sanguins et aux CVO chez les patients drépanocytaires et qui ont été décrites dans cette partie.

Ce schéma relate de manière non exhaustive, un grand nombre d'interactions qui ont été observées expérimentalement dans le cadre de la drépanocytose. Cependant, elles n'ont jamais toutes été observées dans une même étude et ne se produisent donc pas obligatoirement toutes lors de l'apparition de CVO. Kato et al. ont proposé de classer deux sous-phénotypes de la drépanocytose. Ils observent qu'un haut niveau d'hémolyse est relié à une forte baisse de la biodisponibilité du NO, ce qui conduit à de l'HTAP, du priapisme, des AVC et des ulcères aux jambes. En parallèle, il semblerait que l'apparition des CVO est beaucoup moins dépendante de l'hémolyse mais plutôt des adhésions réticulocytaires et leucocytaires (18). Ces suggestions nécessitent d'autres investigations plus fondamentales et pourraient mener à une division de la figure proposée en fonction des deux ou plusieurs autres sous-phénotypes.



- 1:** l'hémolyse participe au stress-oxydatif en libérant de l'Hb contenant du fer qui est très réactif (86) via, entre autre, la réaction de Fenton. Dans l'autre sens, l'auto-oxydation de l'HbS conduit à la production de ROS fragilisant les membranes érythrocytaires et donc favorisant l'hémolyse (69) ;
- 2:** la déshydratation, en augmentant la concentration intracellulaire en HbS facilite la polymérisation de l'HbS et donc la falciformation des GR, elle-même stimulatrice de l'hémolyse (85) via l'auto-oxydation de l'HbS et la fragilisation de la membrane (69) ;
- 3:** en stimulant les canaux K/Cl, le stress-oxydatif pourrait participer à la déshydratation des GR (68) ;
- 4:** l'hémolyse libère de l'hème dans la circulation, stimulant l'activation leucocytaire, ce qui va activer la production de ROS par ces cellules via entre autre la stimulation de la NADPH oxydase (86) ;
- 5:** l'hémolyse, en libérant l'Hb constituée de fer qui va réagir avec les membranes, tout comme le stress-oxydatif, vont participer aux lésions membranaires sur les CE ce qui va stimuler l'inflammation ;
- 6:** en participant à la consommation du BH4 (309), un substrat des NOS, le stress-oxydatif participe au découplage des NOS ce qui entraîne en retour une production de ROS par cette enzyme (341) ;
- 7:** le stress-oxydatif diminue la biodisponibilité du NO par la réaction de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> avec le NO afin de former du peroxynitrite, ce qui va, en retour, augmenter le stress-oxydatif (343);
- 8:** l'hémolyse induit la consommation du NO via l'Hb libre (342) tandis que la libération d'arginase par les GR lysés va favoriser le découplage des NOS en consommant son substrat, la L-arginine (341) ;
- 9:** en stimulant les canaux Gardos, l'ET-1 participe à la déshydratation érythrocytaire (65) ;
- 10:** la diminution de la biodisponibilité du NO participe à lever l'inhibition que le NO avait sur la production d'ET-1 et de ses effets vasoconstricteur, ce qui conduit à les stimuler (109) ;
- 11:** la diminution de la biodisponibilité du NO lève les effets inhibiteurs du NO sur l'agrégation plaquettaire (18) ainsi que sur l'activation de NFκB (202) qui ne sont alors plus inhibés et peuvent donc être activés ;
- 12:** l'agrégation plaquettaire est initiée par la liaison de plaquettes à P-sélectine exprimée par les CE activées et cet agrégat est ensuite constitué grâce au fibrinogène qui permet de lier les plaquettes entre elles (258) ;
- 13:** la cascade de coagulation permet la production de fibrine qui va aller stabiliser l'agrégat plaquettaire qui devient alors un thrombus (261) ;
- 14:** l'activation endothéliale par NFκB induit l'expression par les CE des molécules d'adhérence vasculaire qui vont participer à lier les leucocytes (237) et les GR SS (224) à l'endothélium.

Partie 3 : Réponse à  
l'ischémie/reperfusion  
dans la drépanocytose

La précédente partie a permis de constater que la CVO peut être influencée par une multitude de facteurs (inflammation, adhésion vasculaire, hémostasie, stress-oxydatif et modulation du tonus vasculaire) interagissant les uns avec les autres. Le stress d'ischémie/reperfusion (I/R) constitue aussi un des facteurs pouvant intervenir dans le déclenchement de ces CVO. En effet, l'hypoxie-ischémie peut stimuler la falciformation des GR avec les conséquences qui en découlent et qui ont été présentées précédemment (Partie 1 et 2) dont les occlusions vasculaires. De plus, comme nous allons le voir dans cette partie, la reperfusion qui suit l'ischémie ou l'hypoxie stimule tous les mécanismes participant à la crise vaso-occlusive, indépendamment de l'effet de l'HbS.

## I. MECANISMES MIS EN JEU DANS L'ISCHEMIE/REPERFUSION

Le processus d'ischémie-hypoxie/reperfusion-réoxygénation fait appel : (i) à la notion de raréfaction d'oxygène dans le sang et donc dans les tissus, c'est l'ischémie ou l'hypoxie et (ii) au réapprovisionnement en O<sub>2</sub>, la reperfusion. Chez l'Homme comme chez l'animal, ce processus peut provenir de sources différentes :

❖ Une diminution de la pression partielle de l'oxygène (PO<sub>2</sub>) au niveau environnemental, que l'on appelle hypoxie, et qui traduit la réduction de l'approvisionnement en O<sub>2</sub> (358). Il existe deux types d'hypoxie environnementale : (i) l'hypoxie hypobare causée par une diminution de la pression atmosphérique, comme c'est le cas en altitude, ce qui diminue la PO<sub>2</sub> dans l'air inspiré et, (ii) l'hypoxie normobare qui peut être induite expérimentalement en laboratoire en diminuant artificiellement la PO<sub>2</sub> par l'ajout d'azote ou d'un autre gaz en excès.

❖ L'ischémie désigne une diminution relative ou absolue de l'approvisionnement en sang d'un tissu ou organe et dont la source peut être diverse et interne : anémie, infarctus, insuffisance cardiaque, occlusion vasculaire, transplantation d'organe, chirurgie vasculaire (359)... Dans le cadre des recherches menées sur l'I/R, la majorité des études s'effectuent sur des modèles animaux et l'ischémie est reproduite suite à une opération invasive consistant à poser un clamp, à ligaturer temporairement un vaisseau du système artériel ou veineux où à le chauffer afin de réduire fortement, voire d'arrêter le flux sanguin.

Ces deux mécanismes sont suivis généralement par un phénomène nommé reperfusion qui consiste en la restauration du flux sanguin, ce qui va permettre le redémarrage du métabolisme aérobie ainsi que la récupération tissulaire. Elle est cependant souvent accompagnée de lésions tissulaires significatives associées à des dysfonctionnements endothéliaux, une réponse inflammatoire importante et une forte production de ROS (358).

### I.1. ISCHEMIE/REPERFUSION ET REPONSE INFLAMMATOIRE

#### I.1.i. INFLAMMATION ET I/R

Un épisode d'I/R se caractérise par une domination du statut pro-inflammatoire causé par la réoxygénation tissulaire. Cette réoxygénation est impliquée dans une part importante des dégâts de reperfusion (358). Des augmentations de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8 (360-369) et de chimiokines (370) ont en effet été observées en réponse à l'I/R et dans les jours qui suivent ce stress. TNF- $\alpha$  semble être une molécule clé dans la réponse à l'I/R en participant aux dysfonctionnements endothéliaux parmi lesquels l'activation accrue du facteur de transcription NF $\kappa$ B. Cette activation stimule la production de molécules d'adhérence vasculaire, de cytokines et de chimiokines (361,364,370-371). En parallèle, TNF- $\alpha$  semble être impliqué dans la formation de zones d'infarctus comme en attestent Maekawa et al. qui observent suite, à une I/R, une diminution significative de la zone infarctée chez des souris KO pour TNF- $\alpha$  comparées à des souris contrôles (371). L'étude de la réponse à l'I/R chez des souris KO pour TNF- $\alpha$  a permis de démontrer le rôle important que joue cette cytokine sur la modulation du tonus vasculaire ou du stress-oxydatif, ce qui sera précisé dans les chapitres qui suivent. Enfin, l'étude de Kurrelmeyer et al. a montré qu'en réponse à une I/R, la liaison de TNF- $\alpha$  sur ses récepteurs TNFR1 et TNFR2 permettrait d'orchestrer une réponse du myocarde sous forme de signaux anti-apoptotiques et cytoprotecteurs afin de limiter les dégâts liés à la reperfusion (372). Les auteurs expliquent ce résultat contradictoire en suggérant que le bénéfice à court terme de TNF- $\alpha$  pourrait être perdu si son expression devient excessive ; dans ce cas, l'effet bénéfique de TNF- $\alpha$  pourrait être contrebalancé par l'effet négatif et cytotoxique de la molécule (372).

### I.1.ii. ADHESION VASCULAIRE ET I/R

La production, induite par l'I/R, des cytokines pro-inflammatoires et des molécules d'adhérence vasculaire a pour conséquence majeure d'augmenter de manière drastique l'adhésion leucocytaire, essentiellement des neutrophiles, et leur migration trans-endothéliale (363,373-377). Suite à l'I/R, les sélectines P et E sont surexprimées (374,378-379) et participent à augmenter le « rolling » des neutrophiles le long de l'endothélium. En parallèle, la surexpression d'ICAM-1 (366) augmente les liaisons stables des cellules sanguines via LFA-1 et Mac-1 (374,378,380).

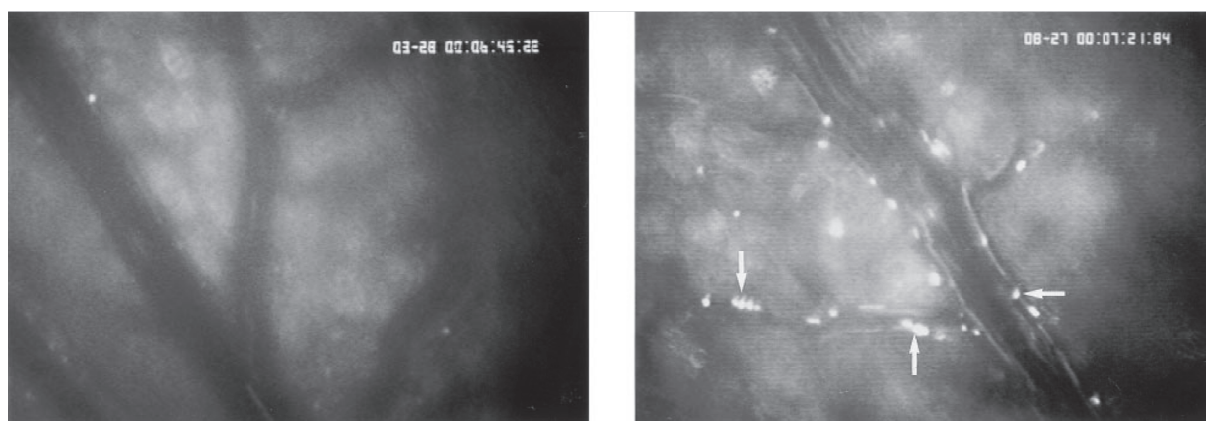
L'utilisation de souris déficientes en molécules d'adhérence vasculaire ou bien d'anticorps dirigés contre ces molécules met en avant leur implication dans l'adhésion leucocytaire suite au stress d'I/R. En effet, il a été observé que des souris présentant un KO pour ICAM-1, P-sélectine, E-sélectine ou L-sélectine présentent une diminution de l'adhésion des neutrophiles suite à l'I/R (363,373,376,379) ainsi qu'une atténuation de leur infiltration et de la taille de l'infarctus (378-379). De même, l'inactivation par des AC spécifiques de VCAM-1, E- ou P-sélectine ainsi que des intégrines LFA-1 et Mac-1 (374-375,377) limite les liaisons neutrophiles/endothélium suite au stress d'I/R.

Ainsi, un stress d'I/R provoque une forte augmentation des concentrations en neutrophile dans l'interstitium des tissus ischémiés/reperfusés (373). Cela entraîne des dommages considérables causés, en partie, par les neutrophiles activés. Ces derniers induisent une production massive de ROS et libèrent le contenu de leurs granules, dont la myéloperoxydase (360,365,367-368,381-386) fortement oxydative, ce qui participe à la dégradation des protéines de la MEC et à la nécrose tissulaire (358).

### I.1.iii. HEMOSTASE ET I/R

Le dernier volet de la réponse inflammatoire à un stress d'I/R est le comportement vasculaire du point de vue de l'hémostase. L'adhésion plaquettaire est augmentée en réponse à l'I/R (387-391) comme on peut l'observer sur la figure 20 (image de droite), ou l'intensité de fluorescence correspondant aux plaquettes marquées est fortement amplifiée (figure 20). Cette adhésion cellulaire à l'endothélium semble être dépendante de la P-sélectine (plaquettaire et endothéliale) ainsi que de son récepteur PSGL-1 puisque l'invalidation par KO ou l'inhibition de ces derniers limitent significativement l'adhésion

plaquettaire (387). Massberg et al. observent cependant que la P-sélectine endothéliale joue un rôle plus important que la P-sélectine plaquettaire dans l'adhésion cellulaire (389) et cela pourrait être dû à la liaison entre la P-sélectine endothéliale et PSGL-1 exprimé au niveau plaquettaire (387). En parallèle, d'autres études montrent que la molécule d'adhérence ICAM-1 pourrait aussi jouer un rôle dans l'adhésion plaquettaire, en liant le fibrinogène circulant qui est lui-même lié par les plaquettes via le récepteur  $\alpha_{IIb}\beta_3$  exprimé par ces dernières (388,390). Enfin, deux molécules participant à l'adhésion plaquettaire sont augmentées suite à un stress d'I/R : le facteur vWF (391) et les dépôts de fibrinogènes (388,390).



**Figure 20 : Adhésion plaquettaire observée en microscopie intravitale suite à un stress d'I/R.**

Les plaquettes sont marquées à la Rhodamine 6G qui est fluorescente et l'adhérence est observée dans des veinules postcapillaires de la muqueuse intestinale. A gauche, une souris sham sans I/R et à droite, une image prise suite à une I/R. Grossissement X450. Images tirée de Massberg et al. (389)

La cascade de coagulation, qui permet la formation de fibrine afin de stabiliser le caillot plaquettaire, est de même activée suite à l'I/R (359,392-397). Le TF joue un rôle important dans cette activation puisque lorsque son activité est inhibée, la formation de fibrinopeptide A (un marqueur de la formation de fibrine) est réduite (392). L'augmentation de plusieurs marqueurs et molécules suggérant l'activation de la voie de coagulation (fibrinopeptide A, TF, PCA -marqueur de l'activité pro-coagulante-, TAT -marqueur de coagulation et de formation de la thrombine-, PT -marqueur des concentrations en facteurs de coagulation-) a par ailleurs été observée en réponse à une I/R (359,392-398). De plus, les dépôts de fibrine augmentent suite à l'I/R (359,395,397-398) tandis que le fibrinogène circulant, qui permet de former la fibrine diminue significativement (394).



En parallèle, l'activité fibrinolytique est augmentée dans les 30min-1h après le début de la reperfusion, puis réduit fortement (394,396-397). En effet, alors qu'au début de la reperfusion le tPA (activateur du plasminogène) et les produits de dégradation de la fibrine augmentent, ces marqueurs diminuent par la suite (394,396-397). De plus, les concentrations en ATIII (inhibiteur plasmatique de la thrombine et du FXa) diminuent (394,396-397,399). Ce comportement fibrinolytique pourrait s'expliquer par l'évolution des concentrations sanguines en PAI-1 (inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 comme le tPA). Son activité ne varie pas pendant la 1<sup>ère</sup> heure de reperfusion, ce qui correspond à l'accroissement de l'activité fibrinolytique observée, puis augmente, ce qui marque l'inhibition de la fibrinolyse et permet à l'activité pro-coagulante d'augmenter (396-397).

Enfin, l'adhésion plaquettaire, tout comme l'activité pro-coagulante, semble être impliquée dans le recrutement leucocytaire et l'accumulation de neutrophiles. En effet, l'inhibition du FXa permet de réduire le recrutement leucocytaire suite à l'I/R (359), tout comme la déplétion en plaquettes (391). D'après Salter et al., la stimulation de P-sélectine par les plaquettes adhérentes serait impliquée dans la première adhésion des leucocytes à l'endothélium et leur « rolling » suite à un stress d'I/R (400).

Pour conclure, la balance entre activité pro-coagulante et fibrinolyse est rapidement déséquilibrée durant la reperfusion et permet de consolider les zones d'adhérence plaquettaire par un maillage de fibrine. Ce mécanisme est doublement impliqué dans les dégâts de reperfusion en favorisant l'hémostase, ainsi qu'en augmentant le recrutement et l'infiltration leucocytaire.

## **1.2. ISCHÉMIE/REPERFUSION, STRESS-OXYDATIF ET MODULATION DU TONUS VASCULAIRE**

### **1.2.i. STRESS-OXYDATIF ET I/R**

Le stress-oxydatif, au même titre que la modulation du tonus vasculaire, participe de manière importante aux dégâts liés à l'I/R et se trouve impliqué dans des dommages organiques (381,384,401-405). Le comportement des ROS en réponses à l'I/R est sans équivoque avec une augmentation de la production des radicaux libres  $O_2^{\bullet}$  (406-407) ainsi qu'une augmentation des peroxydations lipidiques (360,365,367-368,381,383-385,405-417),

des oxydations protéiques (384,413,416-419) et des oxydations de l'ADN (420) qui sont fortement dommageables pour les cellules (tableau 5). Cette importante production de ROS peut être expliquée 1) par la stimulation de la XO induite par la reperfusion (403,421) ainsi que par TNF- $\alpha$  (364) et 2) par la NADPH oxydase (420-421) présente, entre autre, dans les neutrophiles activés (358).

En parallèle, l'I/R cause une forte diminution des défenses antioxydantes enzymatiques : une baisse de l'activité de SOD, catalase et GPx est observée dans différents organes soumis à une I/R expérimentale (365-368,384,405,408-411,413,416-417) tandis que le substrat de la GPx, la GSH, est elle aussi réduite (365,381). Cela suggère un épuisement des défenses antioxydantes devant une trop forte production de ROS (tableau 5).

Ainsi, la balance oxydative présente un fort déséquilibre suite à l'I/R avec comme conséquences une forte production de ROS et peu de défenses antioxydantes pour limiter les dommages cellulaires.



### I.2.ii. NO ET IR

Suite à un stress d'I/R, un grand nombre d'études montre une augmentation des NOx (marqueur de l'effet du NO sur la fonction endothéliale (335)) pendant la phase de reperfusion (360,366-367,382-383,412-414,416-417,423-427). Cette augmentation a en effet été observée dans quasiment tous les tissus testés (foie, rein, intestin, poumon, cœur, membre supérieur ou vessie), sur plusieurs modèles animaux (souris, rat, lapin, hamster) et suite à des protocoles d'ischémie allant de 45min à 2h et des temps de reperfusion allant de 30min à 36h (tableau 6). Cependant, deux études contredisent ces résultats : dans le cerveau, Abdallah et al. observent une diminution des concentrations en NOx suite à une ischémie assez courte (15min) et 60min de reperfusion (365) tandis qu'Ofluoglu et al. n'observent pas de variation significative des concentrations en NOx suite à une I/R dans le foie (415). En parallèle, les concentrations ou activités des NOS (iNOS, eNOS, et nNOS) augmentent avec l'I/R dans la majorité des études (360,367,408,424-425,427-431) hormis pour trois études (385,425,429) ou elles ne présentent pas de variation entre avant et après l'I/R (tableau 6).

L'effet physiologique de cette augmentation des activités/concentrations en NOS et NOx, est interprétable de deux manières différentes selon la littérature. Certaines études observent un effet protecteur du NO sur les dégâts liés à l'I/R tandis que d'autres études soulignent plutôt les effets cytotoxiques du NO, qui participeraient aux dommages cellulaires liés à l'I/R. Afin de comprendre les effets du NO sur la réponse à un stress d'I/R, les études ont majoritairement été menées sur des modèles animaux chez qui les effets de l'inhibition (ex: L-NAME) ou de l'inactivation (KO pour iNOS, eNOS) des NOS ont été testés expérimentalement.

Dans les études ayant utilisé l'inactivation des NOS, l'effet protecteur du NO est démontré par une augmentation des dégâts de reperfusion avec augmentation de la taille des infarctus (422,430), des dommages cellulaires (432), des oxydations lipidiques (412) et une diminution du flux sanguin (412) en comparaison à des conditions contrôles avec I/R. Cela suggère que les NOS et donc leur produit final, le NO, pourraient permettre, suite à l'I/R, de limiter l'importance de la zone d'infarctus, la fragmentation de l'ADN (422) et les

oxydations lipidiques (412). Les mécanismes de cet effet protecteur du NO ne sont pas encore connus précisément, mais il semblerait que le NO puisse inhiber la voie de NFκB, très impliqué dans l'infiltration cellulaire et les dégâts de reperfusion (433). L'autre hypothèse découle de l'action vasodilatatrice du NO qui permettrait d'améliorer le flux sanguin et donc de limiter l'ischémie tissulaire (433).

Ces observations sont cependant fortement contredites par d'autres études qui observent que l'inhibition des NOS conduit à une diminution des dégâts de reperfusion (413,429), avec une diminution des œdèmes cérébraux (434), de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (435) ainsi que du « rolling », de l'adhésion (382) et de l'infiltration des leucocytes (436). Dans ce cas là, le rôle des NOS et de son produit final le NO, semble être plutôt pathogénique en participant aux dommages observés suite aux I/R. Plusieurs mécanismes pourraient conduire à la cytotoxicité des NOS et du NO:

- ❖ Une augmentation de la formation d' $O_2^{\bullet-}$  est observée suite à l'I/R et peut conduire à diminuer la biodisponibilité du NO par la formation du peroxy-nitrite (437). Cette suggestion est confirmée par une augmentation de la nitrotyrosine, un marqueur de la formation de ROS par le NO, suite à une I/R (438). Cette augmentation de la production de ROS par le NO pourrait être impliquée dans l'augmentation de la fragmentation des mitochondries et par conséquent l'apoptose cellulaire (437).

- ❖ En favorisant la formation de peroxy-nitrite et autre ROS, le NO participe à la stimulation du facteur de transcription NFκB (433), ce qui expliquerait l'implication des NOS dans le « rolling », l'adhésion et l'infiltration des leucocytes (382,436).

Ainsi, deux réponses semblent s'opposer suite à une surproduction de NO et plusieurs études expliquent ces réponses opposées en suggérant qu'à faible concentration, le NO pourrait être protecteur tandis que lors d'une stimulation importante comme lors de la reperfusion, les fortes concentrations de NO deviennent alors cytotoxiques et participent aux dégâts tissulaires observés suite à l'I/R (404,429,439).

Auteurs	Durée du stress		Tissu ischémié	Modèle animal	NOx	iNOS	eNOS	nNOS	ET-1
	Ischémie	Reperfusion							
Beasley et al. 1998 (428)	5-10min	4-6h	cerveau	porcelet			↗	↗	
Cai et al. 2007 (408)	2h	24h	cerveau	Rat		↗			
Miranda et al. 2010 (385)	1h	2-6h	foie	Rat		=	=	=	
Trocha et al. 2010 (431)	40min	1h	foie	Rat		↗	↗		
Milsom et al. 2010 (429)	30min	24h	rein	Souris			↗		
Tarin et al. 2011 (430)	30min	24h	cœur	Souris		↗			
Abdallah et al. 2011 (365)	15min	1h	cerveau	Rat	↘				
Bertuglia 2008 (412)	30min	30min	abajoue	hamster	↗				
Ding et al. 2012 (360)	45min	6h	intestin	Souris	↗	↗			
Chen et al. 2009 (383)	2h	24h	Membre supérieur	Rat	↗				
Guyen et al. 2008 (413)	1h	6h	rein	Rat	↗				
Kizilgun et al. 2011 (414)	1h	6h	rein	Rat	↗				
Schneider et al. 2011 (426)	45min	24h	rein	Rat	↗				
Tripatara et al. 2007 (427)	1h	6h	rein	Rat	↗		↗	↗	
Yanarates et al. 2008 (417)	1h	6h	rein	Rat	↗				
Ofluoglu et al. 2006 (415)	1h	24h	foie	Rat	=				
Yao et al. 2009 (367)	1h30	1-24h	foie	Rat	↗	↗			
Bajory et al. 2009 (382)	1h	30min	vessie	Rat	↗				
Masuda et al. 2010 (424)	2h	36h	vessie	Lapin	↗	↗			
Tunc et al. 2009 (416)	45min	3j	intestin	Rat	↗				
Li et al. 2007 (423)	45min	30min-24h	intestin	Rat	↗				
Tian et al. 2006 (366)	1h	2h	intestin	Rat	↗				
Miclescu et al. 2010 (425)	12min	30min-3h	cœur	porcelet	↗	=	=	↗	
Hassan et al. 1997 (440)	15min	30min	estomac	Rat					↗
Soda et al. 1999 (441)	60min	1-3h	intestin	Rat					↗
Jeong et al. 2004 (442)	1h	1-48h	rein	Rat					↗
Goto et al. 1994 (443)	1h	1h	rein	Rat					↗
Kurata et al. 2004 (444)	45min	24h	rein	Rat					↗
Nakajima et al. 2006 (445)	45min	24h	rein	Rat					↗
Gunal et al. 1997 (419)	1h	24h	foie	Rat					=
Kawamura et al. 1995 (446)	1h	1-6h	foie	Chien					↗
Matsumoto et al. 2000 (447)	1h	1h	foie	Lapin					↗
Nagai et al. 2010 (386)	1h30	1-4h	foie	Souris					↗
Seo et al. 2003 (448)	allotransplantation de foie			Chien					↗
Tsuchiya et al. 2003 (449)	1h	6h	foie	Rat					↗
LeDoux et al. 2008 (450)	1h	4h	cœur	Cochon					↗
Vago et al. 2004 (451)	30min	1h30	cœur	Chien					↗

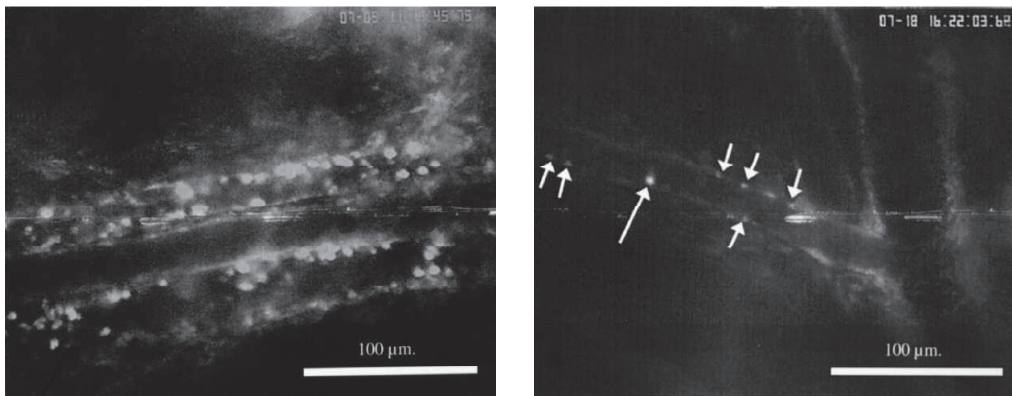
Tableau 6 : Evolution des concentrations et des activités de molécules impliquées dans la modulation du tonus vasculaire.

NOx : nitrite/nitrate ; NO : oxyde nitric ; iNOS : NO synthase inductible ; eNOS : NO synthase endothéliale ; nNOS : NO synthase neuronale, ET-1 : Endothéline-1.

### I.2.iii. ET-1 ET IR

La dilatation étant diminuée suite à une I/R et l'endothélium présentant des dysfonctionnements, il n'est pas étonnant de constater que les concentrations en ET-1 augmentent dans la majorité des études portant sur l'I/R (386,419,440-451) (tableau 6).

Ces augmentations des concentrations en ET-1 ont des répercussions négatives sur les tissus et semblent participer aux dégâts causés par l'I/R. Ainsi, certaines études ont observé que suite à l'I/R, l'ET-1 pourrait être impliquée dans les fibrillations ventriculaires (451), dans la formation d'infarctus du myocarde (450) et dans l'augmentation de la pression veineuse dans la veine porte, ce qui contribuerait à des dégâts hépatiques (446). Katsuramaki et al. ont aussi observé que suite à une I/R, les cochons qui ne survivaient pas à 3 jours de reperfusion présentaient des concentrations en ET-1 significativement supérieures à ceux qui survivaient (452). En parallèle, l'inhibition de la fixation de l'ET-1 sur son récepteur ETA induit une limitation du « rolling » et de l'adhésion des leucocytes ainsi qu'une augmentation du nombre de capillaires fonctionnels ce qui suggère aussi une implication de l'ET-1 dans les dysfonctionnements microcirculatoires (453) (figure 21).



**Figure 21 : Images de veinules postcapillaires post I/R obtenues par microscopie intravitale chez le rat.**

Observation de VPC dans la couche musculaire de la vessie suite à une I/R chez des rats contrôles (image de gauche) et chez des rats prétraités avec du BQ610, un antagoniste d'ETA, un récepteur à l'ET-1 (image de droite). Sur ces images, les leucocytes sont marqués à la rhodamine 6G et une forte diminution de leur concentration suite au blocage de l'ETA est observée. Les courtes flèches blanches indiquent les leucocytes roulant tandis que la longue flèche blanche indique les leucocytes adhérant (453)

Ainsi, Bajory et al. ont mis en avant l'importance du récepteur ETA dans les dégâts de reperfusion (453) mais ce n'est pas le seul récepteur à être impliqué. Climent et al. ont constaté qu'en condition non ischémique, l'inhibition de l'ETB induisait une augmentation des vasoconstrictions tandis que suite à une I/R, cette même inhibition induisait une diminution des vasoconstrictions (454). Le récepteur ETB semble donc présenter des

dysfonctionnements suite à l'I/R : normalement, la stimulation de l'ETB permet la libération de NO et de prostaglandine ; suite à une I/R, il semblerait que cette voie de libération de vasodilatateurs soit fortement inhibée, ce qui peut participer à augmenter les dégâts de reperfusion.

## II. REPONSE A L'ISCHEMIE/REPERFUSION CHEZ LES DREPANOCYTAIRES ET SOURIS TRANSGENIQUES DREPANOCYTAIRES

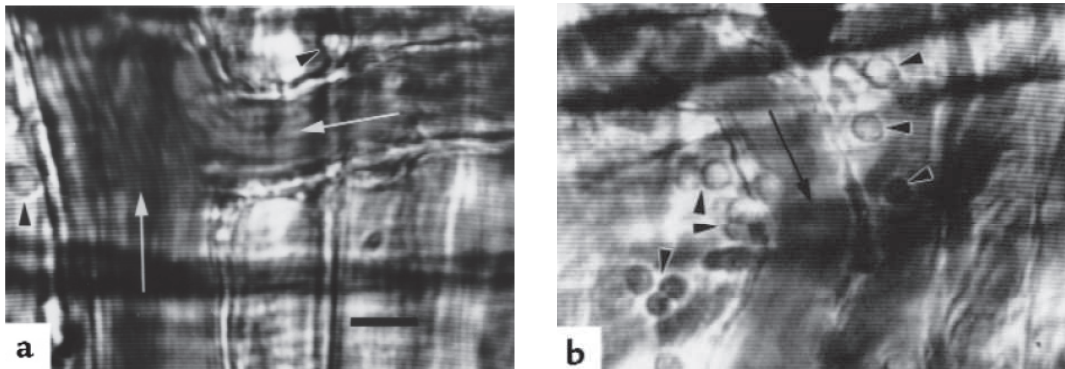
L'organisme des patients drépanocytaires étant, via la récurrence des occlusions vasculaires, fréquemment soumis à des épisodes de reperfusion, la réponse au stress d'I/R qui a été étudié ci-dessus pourrait expliquer en partie les CVO ou, du moins, bon nombre des dommages organiques observés chez ces patients (138-139,455-456). Ainsi, en plus de subir les dysfonctionnements liés à l'HbS, l'organisme des sujets drépanocytaires subit des dommages issus de la reperfusion, ce qui peut participer à amplifier les CVO via la stimulation de l'inflammation, de l'adhérence vasculaire, du stress oxydatif, de la constriction vasculaire et de l'hémostase.

Toutes les études citées dans cette partie et traitant des réponses à la reperfusion dans le cadre de la drépanocytose sont effectuées chez des souris transgéniques drépanocytaires soumises (i) à une ischémie invasive avec pose d'un clamp sur une artère puis reperfusion (I/R) (457-458); (ii) à une hypoxie normobarique afin de provoquer des occlusions vasculaire puis la réoxygénation (H/R) provoquant la reperfusion via réduction des zones occlusives.

Le stress oxydatif étant une des composantes majeures de la reperfusion, il n'est pas surprenant d'observer que suite à une H/R, les souris transgéniques drépanocytaires présentent une augmentation des concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt du stress (138) ainsi qu'une augmentation de l'éthane expiré, qui est un marqueur des peroxydations lipidiques (139). L'expiration d'éthane suite à l'H/R peut, de plus, être inhibée par l'utilisation de l'allopurinol, un inhibiteur de la XO (139). La réoxygénation provoque donc la stimulation de la XO chez les souris drépanocytaires, ce qui pourrait stimuler la production de ROS et le stress-oxydatif.



Quatre heures après le début de la reperfusion, les concentrations en  $H_2O_2$  diminuent et, en parallèle, une augmentation de l'adhésion leucocytaire et des migrations transendothéliales est observée (138). Cela est confirmé par l'augmentation de la myéloperoxydase, sécrétée par les neutrophiles activés et ayant migré suite à l'H/R (109). Il semblerait donc que l'augmentation du stress-oxydatif soit impliquée dans les mécanismes d'adhérence et de migration leucocytaire qui sont amplifiés durant la reperfusion (138). Il a en effet été observé, par microscopie intravitale, et suite à une H/R, une augmentation du « rolling », de l'adhésion et des migrations leucocytaires (128,138,233,459) (figure 22). Celles-ci semblent dépendantes de la P-sélectine car l'inhibition de cette dernière limite fortement les adhérences cellulaires ; à noter que l'inhibition de la E-sélectine ne provoque pas ce changement (138).



**Figure 22 : Image prise en microscopie intravitale d'infiltration leucocytaire suite à un stress d'H/R.** Observation de veinule du muscle crémaster après 3 heures d'hypoxie à 10% d' $O_2$  et 18h de réoxygénation chez (a) des souris WT montrant peu de leucocyte infiltré (pointe de flèche) et (b) des souris  $\beta^5$  montrant un grand nombre de cellules sanguines ayant migré à travers l'endothélium (pointe de flèche). Les grandes flèches montrant la direction du flux sanguin. Tiré de Kaul et al. (138)

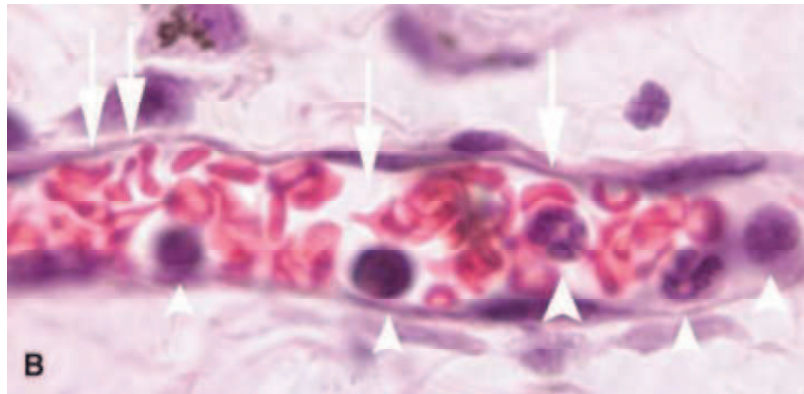
Cette stimulation des mécanismes d'adhésion vasculaire est à mettre en parallèle avec l'augmentation de l'inflammation.  $TNF-\alpha$ ,  $IL-6$  et  $IL-1\alpha$  ainsi que les concentrations en cellules inflammatoires comme les neutrophiles sont stimulés suite à un stress d'H/R dans les bronches des souris SAD (134). Les concentrations plasmatiques en SAP (serum Amyloid P-Component), qui est l'homologue murin de la CRP, sont aussi augmentées suite à une I/R rénale chez des souris S+S-Antilles (458).

Toujours au sujet du stress oxydatif qui semble influencer sur beaucoup de mécanismes participant aux CVO, la nitrotyrosine augmente significativement en réponse à l'H/R (109,460). Ce résultat suggère une baisse de la biodisponibilité du NO et pourrait expliquer, comme le NO est un inhibiteur de l'ET-1, l'augmentation des concentrations en

ET-1 observée chez les souris SAD suite à l'H/R (109). Cette augmentation plasmatique de l'ET-1 semble alors induire la vasoconstriction responsable d'une diminution du flux sanguin rénal (109,130,233). La déshydratation érythrocytaire est aussi stimulée par l'ET-1 qui va participer à l'activation des canaux Gardos lors de la reperfusion (109).

Du point de vue de l'hémostase, l'expression de TF semble augmenter au niveau des cellules endothéliales de veines pulmonaires et des monocytes en réponse à une H/R (141,461). Cela pourrait participer à stimuler la cascade de coagulation et amplifier l'obstruction vasculaire.

Finalement, l'ensemble des mécanismes cités ci-dessus et mis en jeu en réponse à l'I/R ou l'H/R chez les souris transgéniques drépanocytaires pourraient participer à amplifier l'intensité de la crise. Une augmentation des dégâts cellulaires a en effet été observée chez ces souris drépanocytaires, suite à un stress d'H/R ou I/R, aussi bien dans le poumon (134,458) que les reins (130,457-458) ou le foie (128). L'analyse histologique a démontré une augmentation des congestions vasculaires, des séquestrations de GR et de la défaillance rénale avec apoptose cellulaire (460). En parallèle, le nombre de vaisseaux statiques observés en microscopie intravitale augmente significativement suite à 1h de reperfusion chez les souris S+S-Antilles (233) (figure 23).



**Figure 23 : Image d'une coupe histologique d'une veinule présentant une obstruction vasculaire suspectée suite à un stress d'H/R chez une souris drépanocyttaire.**

Veinule dorsale de la peau observée chez des souris S+S-Antilles suite à 1 heure d'hypoxie à 7% d'O<sub>2</sub> et 1h de réoxygénation. Les pointes de flèches blanches montrent les leucocytes qui semblent adhérer à l'endothélium vasculaire tandis que les flèches blanches pointent les GR déformés. Image de Kalambur et al. (233).

Partie 4 : Exercice  
physique aigu et  
chronique, drépanocytose  
et crises vaso-occlusives

L'exercice physique aigu, qui est un événement ponctuel, entraîne une réponse de l'organisme dans le but d'effectuer un mouvement. La réalisation de ce mouvement est accompagnée d'une forte demande métabolique qui conduit à des modifications physiologiques ayant pour but de maintenir l'homéostasie. Cela inclut notamment l'activation de voies métaboliques afin de produire de l'ATP, l'activation du système neuromusculaire, une thermorégulation adéquate ainsi qu'une activation ventilatoire et cardiovasculaire.

La répétition de cet exercice physique jour après jour, appelée entraînement physique ou exercice chronique, conduit à des adaptations cellulaires et moléculaires durables de l'organisme menant à une nouvelle homéostasie (aussi appelée allostasie). Cela permet la mise en place de mécanismes pouvant contrer les effets potentiellement délétères d'un exercice aigu et à une meilleure réponse physiologique à cet exercice. De plus, ces adaptations conduisent à une amélioration de la force, de la puissance et de la vitesse de réalisation du mouvement ainsi qu'à une diminution de la fatigabilité musculaire (462).

Nous verrons dans cette partie de quelle manière l'exercice physique aigu et surtout l'entraînement peuvent potentiellement influencer sur les mécanismes impliqués dans la physiopathologie drépanocytaire.

## **I. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A L'EXERCICE AIGU ET CHRONIQUE CHEZ LES SUJETS SAINS ET PATHOLOGIQUES**

### **I.1. EXERCICE ET INFLAMMATION**

La réponse inflammatoire à un exercice physique est un sujet très étudié notamment dans le cas de pathologies impliquant une hausse de cytokines inflammatoires tels que le diabète de type 2, les pathologies cardiaques ou encore le syndrome métabolique. L'intérêt de ces études est de déterminer si un entraînement composé d'exercices physiques réguliers peut être bénéfique pour les sujets atteints de ces pathologies.

#### **I.1.i. REPONSE INFLAMMATOIRE A L'EXERCICE AIGU**

Il semblerait, d'après l'hypothèse de Petersen et Pedersen qu'un exercice physique aigu puisse avoir des vertus anti-inflammatoires en induisant l'augmentation plasmatique de

la cytokine IL-6 qui permettrait de stimuler la libération de molécules anti-inflammatoires telles qu'IL-1ra et IL-10. Cela est confirmé par la forte augmentation de la cytokine IL-6 en réponse à un exercice aérobic maximal (123,463) ou sous maximal (464-474). C'est aussi le cas pendant la phase de récupération (123,467,475) bien que, à plus faible intensité (30% de la VO<sub>2</sub>max), IL-6 n'est pas influencée par l'exercice (474). Il en est de même pour IL-1ra (468-469,471-472,476) et IL-10 (465,469-470,476) qui augmentent suite à un exercice sous maximal. L'exercice anaérobie composé d'exercices en résistance n'induit cependant pas de variation post exercice en IL-6 plasmatique (474,477), excepté lorsque la charge est augmentée. Dans ce cas, les concentrations en IL-6 augmentent à l'arrêt de l'exercice (474). Au sujet des cytokines normalement libérées lors d'un processus inflammatoire, TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , l'effet de l'exercice sur leur libération est sujet à controverses. En réponse à un exercice sous-maximal, les auteurs observent des augmentations (468,470,473) ou une absence de variation (469,471-472) et ce, indépendamment de l'intensité de l'exercice. Ainsi, il semblerait qu'en réponse à un exercice aigu, la cascade inflammatoire mis en jeu soit différente de celle observé lors d'une infection (TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ). Elle s'apparenterait plus à celle activé lors d'une réponse à un traumatisme (163,478). Cette suggestion est confortée par l'observation d'une relation entre la concentration en IL-6 et les dommages musculaires engendrés par l'exercice (479).

#### I.1.ii. MODULATION DES REPOSES INFLAMMATOIRES A L'ENTRAINEMENT

L'effet anti-inflammatoire de l'entraînement pourrait être la conséquence de la stimulation régulière de IL-6 et donc une production fréquente de IL-10 et IL-1ra (163) qui permettrait une amélioration de l'état inflammatoire des patients atteints de pathologies impliquant l'inflammation.

Chez les sujets et rats sains, l'exercice physique régulier n'induit pas de diminution, au repos, des cytokines IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (480-485) bien que la CRP présente des concentrations plus faibles en fin de protocole d'entraînement (482,486-487). L'absence de pathologie dans les groupes expérimentaux pourrait expliquer cette absence de variations en cytokines inflammatoires. Celles-ci n'étant pas stimulées au repos chez ces sujets, les cytokines sont présentent en faibles concentrations en début de protocole et la marge est alors trop faible pour observer des variations post entraînement.

Il en est différemment chez les patients atteints de pathologies inflammatoires. Dans leur cas, certaines études montrent qu'un entraînement composé d'exercices réguliers aérobies et parfois de résistance permet de réduire les concentrations au repos en IL-6, CRP et TNF- $\alpha$  (488-490), ce qui est confirmé chez l'animal (484-485). Cela est cependant à contraster avec les résultats d'autres études qui n'observent aucune variation de ces cytokines au repos après un protocole d'entraînement (488-489,491-493).

## **I.2. EXERCICE ET MOLECULES D'ADHERENCE VASCULAIRE**

### **I.2.i. ADHERENCE VASCULAIRE EN REPONSE A UN EXERCICE AIGU**

Un exercice physique est connu pour accroître, au niveau musculaire, les lésions tissulaires et endothéliales conduisant à l'installation d'un processus inflammatoire. De plus, il augmente la demande musculaire en oxygène ce qui aboutit à un accroissement de la fréquence cardiaque et des contraintes de cisaillement (494). Ainsi, il n'est pas étonnant d'observer la stimulation des mécanismes d'adhésion vasculaire suite à un exercice aigu puisque l'inflammation et les contraintes de cisaillement en sont des activateurs. Cette activation endothéliale est cependant tributaire de l'intensité et de la durée de l'exercice (tableau 7).

Alors qu'un exercice anaérobie n'induit aucune variation en molécules solubles d'adhérence vasculaire chez des sujets sains (475,495), certaines études montrent une augmentation des concentrations plasmatiques en sICAM-1, sVCAM-1, sP, sL et sE-sélectines après des exercices maximaux (496-497) ou sous-maximaux (466-467,498-500) (tableau 7). Ces résultats sont cependant contrastés par d'autres études n'observant pas de variation de ces molécules suite à un exercice aérobie (122-123,463,480,496,498-499,501-504) (tableau 7). Les résultats sont sensiblement les mêmes chez des sujets atteints de pathologies cardiaques, métaboliques ou vasculaires. Ces sujets présentent dans de nombreuses études une hausse des concentrations plasmatiques en molécules d'adhérence solubles suite à ces différents types d'exercices (466-467,480,499,501-503,505-507) bien que dans certains cas, l'exercice semble ne pas modifier pas l'expression de ces protéines (499,502-503).

Références	type d'exercice	sVCAM-1			sICAM-1			sP-sélectine			sE-sélectine			sL-sélectine		
		sédentaires sains	entraînés sains	sédentaires malades	sédentaires sains	entraînés sains	sédentaires malades	sédentaires sains	entraînés sains	sédentaires malades	sédentaires sains	entraînés sains	sédentaires malades	sédentaires sains	entraînés sains	sédentaires malades
Signorelli et al. (466)	exercice aérobic sous-maximal	↗		↗				↗		↗	↗		↗			
Collins et al. (499)					=		=	↗		↗						
Zietkowski et al. (480)								=		↗						
Von Kanel et al. (467)					↗		↗									
Bartzeliotou et al. (498)			↗			↗			=			↗				
Akimoto et al. (504)						=										
Nielsen et al. (500)			↗			↗						↗			↗	
Lara Fernandes et al. (507)				↗												
Mizia-Stec et al. (502)	exercice aérobic maximal	=		↗	=		=		=		=		↗			
Silvestro et al. (501)					=		↗									
Brevetti et al. (503)				↗	=		↗	=		=		=				
Silvestro et al. (505)				↗			↗									
Boos et al. (506)														↗		
Schmidt-Lucke et al. (497)		↗														
Rehman et al. (496)					↗							=				
Monchanin et al. (122)						=										
Chaar et al. (463)					=			=						=		
Tripette et al. (123)				=				=							↗	
Petridou et al. (495)	exercice anaérobic	=		=	=		=		=		=		=		=	
Smith et al. (475)		=			=											

**Tableau 7 : Evolution des concentrations en molécules d'adhérence solubles en réponse à différents types d'exercices physiques aigus chez des sujets sains ou atteints d'une pathologie.**

↗Tex : augmentation des concentrations de la molécule soluble avec l'exercice vs. pré-exercice ; =Tex: absence de variation entre avant et après l'exercice.

Ainsi, ces résultats suggèrent que chez des sujets pathologiques ou sains, des exercices maximaux et sous maximaux pourraient dans certains cas aboutir à une activation endothéliale accrue, révélée par une augmentation des molécules solubles d'adhérence. Enfin, il a été montré que suite à un exercice aérobie, le nombre de leucocytes augmente (471,508) et qu'ils expriment plus d'intégrine LFA-1 (508-510) et Mac-1 (500) ainsi que plus d'ICAM-1 (lymphocytes) (509). Les leucocytes semblent donc être, à l'arrêt de l'exercice, dans une bonne disposition pour adhérer à l'endothélium bien qu'il n'a cependant pas été observé que l'exercice induisait une augmentation de la capacité à adhérer des leucocytes (198,511).

#### I.2.ii. ADHERENCE VASCULAIRE EN REPONSE A UN ENTRAÎNEMENT PHYSIQUE REGULIER

En réponse à un entraînement en endurance, les résultats des valeurs de repos pré-post entraînement sont contrastés chez les sujets sains. Adamopoulos et al. ont observé suite à 12 semaines d'entraînement une réduction des concentrations plasmatiques basales en sVCAM-1 et sICAM-1 (512). En revanche, dans 4 autres études le protocole d'activité physique régulière n'a pas modifié ces concentrations (483,513-515). Du point de vue de la capacité à adhérer des GB, des études ont montré que les sujets sains entraînés présentaient une adhésion *in vitro* de leurs GB diminuée comparé à des sujets sains sédentaires (511,516).

Les effets d'un entraînement sur l'adhésion vasculaire sont plus documentés dans le cas de pathologies comprenant une composante inflammatoire. Des dysfonctionnements endothéliaux étant présents, l'activité physique régulière semble alors agir comme un facteur limitant les concentrations plasmatiques en molécules d'adhérence solubles chez l'Homme et leur expression endothéliale chez l'animal. Plusieurs études ont en effet observé une réduction, au repos, des concentrations plasmatiques en sVCAM-1, sICAM-1, sP- et sE-sélectines en réponse à l'entraînement chez des sujets souffrant de problèmes cardiaques, de maladie artérielle périphérique, ou ayant subi une transplantation cardiaque (488,512,517-518). Là encore, d'autres études ne présentent, au repos, aucune variation post entraînement de ces concentrations (493,507,515,518-520).

Chez l'animal, il a été rapporté dans le cadre de l'asthme, du diabète ou de hautes cholestérolémies, que l'entraînement physique des animaux était associé à une diminution de l'expression endothéliale de ICAM-1, VCAM-1 et P-sélectine (484,521-522) et à une



diminution de l'adhésion et de l'infiltration leucocytaire (522-523). L'activité physique régulière permet en outre de limiter l'augmentation de l'expression de ICAM-1 provoquée par l'occlusion d'une artère cérébrale (524).

Ainsi, les études chez l'animal permettent de confirmer les tendances observées chez l'Homme avec pour certaines études, une baisse des concentrations en molécules d'adhérence solubles suite à la mise en place d'une activité physique régulière. Cela confère donc à l'entraînement un effet « anti-adhésif », limitant l'expression endothéliale des molécules d'adhérence, exprimées essentiellement dans le cas de pathologies impliquant un dysfonctionnement endothélial.

### **I.3. EXERCICE ET HEMOSTASE**

#### **I.3.i. HEMOSTASE ET EXERCICE AIGU**

L'exercice aigu et intense est associé à des risques de décès accrus (525) bien qu'atténués par l'exercice régulier (526). Dans 70% des cas de mort subite observés chez des sujets de plus de 35 ans ayant pour la plupart des infarctus du myocarde liés à l'exercice, la présence d'occlusion des coronaires par des thrombus riches en plaquettes a été observé (527). Cela pourrait être le résultat d'un déséquilibre entre cascade de coagulation et fibrinolyse qui pourrait être constaté chez des sujets non accoutumés à l'exercice physique et surtout présentant des pathologies impliquant l'hémostase.

Chez des sujets sains, un exercice sous-maximal induit une augmentation des concentrations en marqueurs de la cascade de coagulation : facteur de coagulation FVIII (528) et FVII (529), fragment pro-thrombotique 1.2 (530-533), TAT (thrombine-anti thrombine III) (530-533), fibrinopeptide A (530,533) et fibrinogène (528) bien que l'augmentation de ce dernier soit plus contrastée (525,530). En parallèle, une hausse des marqueurs de l'activité fibrinolytique est généralement observée après un exercice sous-maximal : augmentation du t-PA (528-530), du PAI-1 (inhibiteur d'activateur de plasminogène tel que le t-PA) (530), du PAP (plasmin-anti plasmin) (530,532), des produits de la dégradation de la fibrine (530) et du D-dimer (528). Du point de vue du comportement plaquettaire, l'adhésion et l'agrégation plaquettaire semblent être dépendantes de l'intensité de l'exercice puisqu'elles sont augmentées suite à des exercices maximaux ou sous-maximaux (534-535) tandis qu'un exercice sous-maximal modéré induit plutôt une

diminution de ces paramètres (535). Une augmentation du nombre de plaquettes (530-533,536) et du vWF (528) est aussi observée suite à un exercice d'endurance.

Ainsi, chez des sujets sains, l'exercice aérobic sous-maximal semble activer la cascade de coagulation (525) et augmenter parallèlement l'activité fibrinolytique (527). Cela pourrait permettre d'équilibrer la balance et donc de réduire les risques de thrombose (530).

### **I.3.ii. HEMOSTASE ET ENTRAÎNEMENT**

Les effets d'un exercice régulier sur les marqueurs de l'hémostase semblent être bénéfiques en permettant de limiter tout d'abord l'activation, l'agrégation et l'adhésion plaquettaire ainsi que les concentrations en vWF chez les sujets sains (513,536-538). Cela est le cas sur des valeurs prises au repos comme en réponse à un exercice aigu (513,537). Il est de plus intéressant de noter qu'un désentraînement de plusieurs semaines induit un retour à des valeurs basales plus hautes chez ces personnes (513,537).

Du point de vue des marqueurs de l'hémostase, les effets d'un entraînement sont plus contrastés. Chez des sujets sains, l'activité physique régulière induit une augmentation des marqueurs de la coagulation et de la fibrinolyse en réponse à un exercice physique aigu (539) et ne provoque pas de changement de concentration du fibrinogène de repos (483,514).

Cependant, chez des sujets en moins bonne santé, il en est différemment. Une augmentation du niveau d'activité physique chez des personnes âgées a été corrélée avec une baisse des concentrations en fibrine, plaquettes, FVIII, FIX pour les marqueurs pro-coagulants (540). Il en est de même pour les marqueurs de la fibrinolyse avec des concentrations plus basses en D-dimer et t-PA chez des sujets âgés pratiquant régulièrement une activité physique par rapport à des sujets sédentaires du même âge (540). Cette étude est confirmée par celles de Suzuki et al. qui montre, chez des sujets ayant subi un infarctus du myocarde en réhabilitation par l'activité physique régulière, une diminution des marqueurs de l'hémostase comparé à des sujets n'ayant pas bénéficié de cette réhabilitation (541). En revanche, chez des patients insulino-résistants, les concentrations en fibrinogène ne varient pas avec l'entraînement (542).

Il semblerait donc qu'une activité physique régulière puisse être favorable pour des personnes présentant certains troubles de l'hémostase en limitant l'activation des cascades de coagulation et la fibrinolyse. Les données étant peu nombreuses et parfois divergentes, cette conclusion nécessite néanmoins d'être confirmée par d'autres études.

#### **I.4. EXERCICE ET STRESS OXYDATIF**

##### **I.4.i. REPONSE DU STRESS-OXYDATIF A UN EXERCICE AIGU**

Comme nous avons pu le décrire précédemment, le stress-oxydatif joue un rôle important dans certaines régulations physiologiques (signalisation cellulaire, défense immunitaire, inflammation). Il est aussi déterminant sur le plan physiopathologique du fait des dégâts occasionnés par les ROS au niveau cellulaire. Une surexposition des cellules aux ROS suite à un exercice physique aigu pourrait expliquer une partie des dégâts occasionnés par ce dernier sur les cellules et la présence d'une plus forte inflammation et adhérence vasculaire.

En effet, suite à un exercice physique aérobic sous-maximal ou maximal, la présence de marqueurs du stress-oxydatif augmente par rapport aux valeurs basales : les concentrations plasmatiques en MDA et TBARS, deux marqueurs des peroxydations lipidiques, augmentent souvent avec l'effort physique (543-545). Cependant, certaines études présentent des données plus contrastées avec une absence de variation de ces marqueurs (501,546-547). De plus, une augmentation de la production d'anions superoxydes suite à un exercice sous-maximal (547), ainsi que des protéines carbonylées suite à un exercice aérobic (546,548) ont été observées. Ces augmentations de ROS et de marqueurs du stress oxydatif pourraient être la conséquence de la stimulation de la xanthine oxydase lors de la réoxygénation qui survient après différents types d'exercice aérobic : maximal (549) et sous-maximal (464,544).

Du point de vue des défenses antioxydantes, l'étude des glutathions montre, suite à un exercice sous-maximal, une augmentation du glutathion oxydé (GSSG) et une diminution du glutathion réduit (GSH) (550). Comme le GSH sert de substrat à la GPx qui le transforme en GSSG afin de catalyser la dégradation de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ces résultats suggèrent que pendant ce type d'exercice, l'intervention du système antioxydant GPx pourrait être augmentée. Cette hypothèse n'a pas été confirmée par l'étude de Surmen-Gur et al., qui n'ont observé aucune

augmentation de l'activité de la GPx en réponse à un exercice incrémental (543). En revanche, l'activité antioxydante totale est augmentée en réponse à un exercice maximal (546) ou sous-maximal (551-552). Cela suggère donc, qu'en réponse à un exercice aigu qui stimulerait la production de ROS, les défenses antioxydantes augmentent afin de faire face à la production massive de radicaux délétères pour les cellules, tout en maintenant un niveau basal de ROS nécessaire aux fonctionnements physiologiques de l'organisme (545).

#### I.4.ii. EFFETS DE L'ENTRAÎNEMENT SUR LE STRESS-OXYDATIF

En réponse à un entraînement physique régulier, le stress-oxydatif se comporte différemment grâce à une adaptation de l'organisme à ces productions répétées de ROS. En effet, aussi bien chez le rat que chez l'Homme, l'activité des enzymes antioxydantes SOD (481,553-558) et GPx (553,558) augmente avec l'entraînement. La capacité antioxydante totale en fait de même (555). Les effets de l'entraînement sur la catalase sont plus contrastés : selon les études menés chez l'Homme et le rat, l'activité de cette enzyme diminue (554,557), stagne (558-559) ou augmente avec l'entraînement (556) ; l'intervention de cette enzyme est donc moins bien définie en réponse à un entraînement.

Les conséquences de cette défense antioxydante exacerbée en réponse à l'entraînement ne semblent, en revanche, pas avoir beaucoup d'incidence sur les concentrations en marqueurs de l'oxydation protéiques et/ou lipidiques au repos : les concentrations plasmatiques basales en TBARS, MDA, protéines carbonylées, anion superoxyde et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ne varient pas en réponse à l'entraînement régulier (481,555-557). Toutefois, ces études se placent dans un contexte d'analyse effectuée au repos donc sans stimulation des ROS. Ainsi, il se peut qu'en réponse à un stimulus tel qu'un exercice aigu, les concentrations en ROS soient diminuées chez des sujets entraînés comparé à des sujets sédentaires. De même que chez des sujets atteints de pathologies caractérisées par un stress oxydatif élevé, un entraînement physique pourrait diminuer le niveau basal en ROS grâce à cette capacité antioxydant accrue. Cette hypothèse a été confirmée chez des rats âgés présentant de fort taux de ROS au repos : suite à un entraînement sur tapis roulant de 8 semaines, les concentrations en ROS ont diminué de 40% (560). Il en est de même chez des

rats diabétique de type II ou considérés comme « fumeurs » ; les concentrations en MDA et  $O_2^{\bullet}$  diminuent après une session d'entraînement (481,556).

### I.5. EXERCICE ET MODULATEURS ENDOTHELIAUX DU TONUS VASCULAIRE

#### **I.5.i. ENDOTHELINE-1**

L'endothéline-1 joue un rôle dans l'activité physique en intervenant dans la régulation du tonus vasculaire via son action fortement et durablement vasoconstrictrice. Celle-ci permet en effet de participer à la redistribution du flux sanguin, via son récepteur ETA, en faveur des muscles squelettiques en action et au détriment des viscères qui voient leur flux sanguin diminuer (561-562). Cette participation de l'ET-1 à la réponse à un exercice physique aigu sous-maximal est confirmée chez le rat et le cheval où une augmentation de la protéine et de son expression génique est observée dans le cœur, le rein et le plasma (563-565). Cela est moins évident chez les sujets sains, chez qui les concentrations plasmatiques en ET-1 peuvent diminuer suite à un exercice maximal (566-567), ne pas varier (568), ou augmenter 2 heures après un exercice sous-maximal (569). Il en est différemment pour les sujets atteints de pathologies cardiovasculaires ou respiratoires. Chez ces sujets, et en réponse à un exercice aérobic maximal ou sous-maximal, l'ET-1 augmente sans équivoque (566-568). Cette production accrue d'endothéline-1 à l'exercice chez ces sujets pourrait contribuer à aggraver leur état pathologique en réponse à un exercice aigu (566).

Les effets de l'entraînement physique régulier sont relativement peu étudiés mais il semblerait qu'il puisse limiter l'expression de l'ET-1 au repos. Les concentrations de la molécule diminuent dans le plasma de sujets sains après la session d'entraînement (570-571) ainsi que chez des sujets âgés ou ayant bénéficié d'une transplantation cardiaque (572-573). En revanche, d'autres auteurs ont observé, chez des sujets sains, qu'une session d'entraînement en résistance était associée à une augmentation plasmatique basale de l'ET-1 et qu'un entraînement endurant n'induisait pas de variation significative de ces concentrations (574). Ainsi, d'autres études seront nécessaires pour conclure sur les effets avérés de l'entraînement sur l'expression de l'ET-1.

### I.5.ii. BIODISPONIBILITE DU NO

L'ET-1 et le NO sont étroitement liés dans leur action biologique et leurs régulations. Il semble en être de même au cours de l'exercice. En effet, Maeda et al. ont observé chez des rats pratiquant un exercice aigu sous-maximal, une augmentation de l'ET-1 plasmatique associée à une diminution des métabolites du NO (NOx) ainsi que de la eNOS (561). Cela suggère une baisse de la biodisponibilité du NO et cette tendance est confirmée chez l'Homme avec une diminution des NOx en réponse à un exercice incrémental maximal (567,575). De plus chez le rat, un exercice aigu sous-maximal induit une augmentation de la nitrotyrosine plasmatique, un marqueur de la consommation du NO par les ROS (548). D'autres études montrent en revanche l'inverse, à savoir une augmentation de la NOx en réponse à un exercice aigu maximal chez des sujets sains et pathologiques (566-567) alors que chez des rats, l'exercice induit une augmentation de l'expression protéique et de l'activité des NOS (576-577). Ainsi, une hausse de l'ET-1 et du stress-oxydatif à l'effort pourrait conduire à une diminution de la synthèse et de la biodisponibilité du NO (578) ; il est aussi possible que l'augmentation des contraintes de cisaillement provoquée par l'exercice aigu stimule les NOS et donc la production de la NO (579). D'autres investigations seront nécessaires pour examiner ces deux possibilités en fonction du type d'exercice et de son intensité.

Les études portant sur les effets de l'entraînement physique régulier sur le métabolisme du NO sont moins controversées. Dans le cas de personnes atteintes de pathologies cardiovasculaires ou en fort surpoids, l'entraînement permet d'augmenter les concentrations plasmatiques des NOx au repos (580-581). Cette augmentation est associée à une augmentation du flux sanguin (582-583). Cela peut être la conséquence (i) d'une baisse des concentrations en ET-1 parallèlement observées en réponse à l'entraînement (570-571), (ii) d'une augmentation des défenses antioxydantes qui vont neutraliser les ROS et donc la consommation du NO (580), ou (iii) d'une augmentation de l'activité des NOS (584). Chez les sujets sains, l'effet de l'activité physique est associé soit à une augmentation de la production de NOx (537), soit à l'absence de variation pré-post entraînement (554). Au final, l'entraînement physique régulier pourrait produire un effet vasodilatateur dans des cas de pathologies cardiovasculaires en permettant une réduction des dysfonctionnements endothéliaux (579) et donc une amélioration de la symptomatique.

## II. EFFETS DE L'EXERCICE AIGU OU CHRONIQUE SUR LES MECANISMES PARTICIPANT AUX CRISES VASO-OCCLUSIVES CHEZ LES SUJETS PORTEURS D'HEMOGLOBINE S

Les effets de l'activité physique chez les sujets drépanocytaires sont très peu étudiés et décrits dans la littérature car un protocole d'activité physique inadapté peut augmenter les risques de déclencher des complications chez ces patients. L'exercice est cependant assez fréquemment utilisé chez les sujets HbSS comme outil de diagnostic de problèmes médicaux non observable au repos (585). En revanche, la littérature portant sur les effets de cette activité physique chez les sujets porteurs du trait drépanocytaire s'est considérablement enrichie ces dernières années. Ce chapitre permet de dresser un état des lieux de l'avancée des recherches sur l'effet d'un exercice aigu et chronique chez les sujets hétérozygotes ou homozygotes drépanocytaires.

### II.1. EXERCICE AIGU CHEZ LES PORTEURS DU TRAIT DREPANOCYTAIRE

Les sujets porteurs du trait drépanocytaire (PTD) constituent une population considérée comme asymptomatique. En effet, le pourcentage des PTD pratiquant une activité physique ou bien étant sportif de haut niveau est équivalent à celui observé dans la population générale (586-591), traduisant un phénotype non invalidant du trait. De plus, le suivi de sessions d'entraînement chez des PTD ne révèle pas la présence de problèmes médicaux chez ces sujets (592).

Cependant, des cas de mort subite sont relatés dans la littérature. L'armée américaine a été la première à révéler des cas chez des sujets PTD : l'autopsie de quatre recrues ayant succombé à une session d'entraînement très soutenue en altitude conclut à des micro-occlusions diffuses dues à des séquestrations de GR falciformes (113). Ces faits ne sont pas isolés car Kark et al. estiment le risque de mort subite chez les porteurs du trait drépanocytaire (PTD) à 28 à 40 fois plus importantes que chez les non PTD (125). Ainsi, il semblerait que mener un effort physique très intense dans des conditions extrêmes incluant hypoxie, déshydratation, hyperthermie et/ou acidose puisse favoriser la polymérisation de l'HbS chez les PTD, induire la falciformation des GR et donc des occlusions micro-vasculaires (113-114,593-594). Les conséquences incluent la rhabdomyolyse, l'insuffisance rénale, les coups de chaleurs à l'effort, les congestions vasculaires (multi organique) et les vasoconstrictions coronariennes (111-113,593-601).

Au niveau expérimental, plusieurs équipes se sont intéressées à la réponse à l'exercice aigu des PTD tandis que la réponse à l'entraînement n'a pas ou très peu été investiguée chez cette population. Du point de vue des réponses ventilatoires et cardiovasculaires, les PTD ne semblent pas présenter de différences avec les sujets sains, que l'exercice soit mené à basse (602-605) ou haute altitude simulée (606). Ces résultats sont à mettre en balance avec ceux de Le Gallais et al., ayant observé une fréquence cardiaque et une ventilation supérieures chez les PTD pendant un exercice incrémental et maximal ainsi qu'une consommation d'oxygène plus faible (607). De plus, lors d'un exercice mené à une haute altitude simulée ou bien dans des conditions de déshydratation, la falciformation des GR augmente de façon drastique (593,608). Cela pourrait expliquer la faible représentativité des PTD dans des courses menées à haute altitude (4095m pour le point le plus haut) ainsi que leurs plus faibles performances dans ces épreuves (609).

Il a récemment été montré que le réseau microcirculatoire musculaire des PTD était remodelé. Ce remodelage vasculaire est caractérisé par une diminution de la tortuosité des vaisseaux couplée à une augmentation de leur diamètre dans le muscle (124). Cela pourrait être le reflet de dysfonctionnements hémorhéologiques et circulatoires (124) qui forcent cette adaptation afin de permettre une meilleure oxygénation tissulaire et contrebalancer la faible oxygénation due à l'HbS. Certains paramètres hémorhéologiques sont en effet anormaux chez les PTD avec des valeurs de viscosité sanguine plus élevées en réponse à l'exercice (610-612) ainsi que pendant la phase de récupération (117,610-612). L'index de rigidité érythrocytaire, permettant de se rendre compte de la capacité des GR à se déformer, est supérieur chez les PTD au repos (117,611), 24h après l'arrêt de l'exercice (117,610) et en condition de déshydratation (613). De même, l'index d'élongation érythrocytaire, un indice de déformabilité des érythrocytes, est inférieur chez les PTD comparé aux sujets sains. Ainsi, les PTD semblent présenter des désordres hémorhéologiques avec des GR moins déformables se maintenant pendant la phase de récupération et qui pourraient expliquer l'apparition de complications occlusives dans les heures/jours suivant la fin de l'exercice.

L'étude de marqueurs de l'inflammation chez les PTD montre que la concentration plasmatique en IL-6 augmente plus fortement chez les PTD que chez les sujets HbAA après 3 exercices incrémentaux consécutifs ainsi que 1h après l'arrêt du test (123). En revanche, les concentrations plasmatiques en TNF- $\alpha$  ne diffèrent pas significativement entre les PTD et les



sujets HbAA suite à un exercice incrémental maximal ou un exercice continu sous-maximal (121-122). En parallèle, sVCAM-1 est significativement plus concentré dans le plasma des PTD que dans celui des sujets HbAA, et ce aussi bien au repos, que suite à une épreuve incrémentale et maximale et pendant la récupération (121-122). Cependant, Tripette et al. ne retrouvent pas cette différence entre sujets PTD et HbAA pour sVCAM-1 suite à une succession de trois exercices incrémentaux (123). Il est cependant intéressant de noter que dans cette dernière étude, les sujets PTD présentaient une puissance maximale supérieure à celle des études de Monchanin et al. (121-122) (respectivement  $274 \pm 11$  W et  $244 \pm 10$  W). Les sujets semblant plus entraînés dans l'étude de Tripette et al, il est possible qu'une meilleure aptitude physique puisse contribuer à expliquer l'absence de différence entre PTD et HbAA. En effet, comme nous l'avons précisé précédemment, l'entraînement semble diminuer l'activation endothéliale et la présence plasmatique de sVCAM-1 chez les sujets présentant des anomalies cardio-vasculaires (512). Les concentrations plasmatiques en sICAM-1 ne sont en revanche pas différentes entre les deux groupes. Enfin, sL-sélectine est plus concentrée chez les PTD pendant la récupération tandis que sP-sélectine est augmentée plus fortement chez les PTD pendant et à la fin des trois exercices incrémentaux (123).

Sur le plan du stress oxydatif, aucune différence n'a été observée entre une population de PTD et de sujets sains, aussi bien au repos que suite à un exercice sous-maximal (612). Cependant, des études plus récentes montrent qu'un exercice maximal induit une augmentation significative des concentrations en MDA, un marqueur de l'oxydation lipidique chez les PTD (614-615). Du point de vue des défenses antioxydantes, des activités semblables ont été observées entre les PTD et les sujets HbAA pour la SOD, GPx et catalase au repos (614-616), bien que Das et al. aient préalablement constaté une activité basale de la GPx significativement inférieure chez les PTD comparé aux sujets sains (616). En réponse à un exercice incrémental maximal, ces auteurs ont par ailleurs observé une augmentation de l'activité de la SOD chez les PTD et les sujets HbAA immédiatement à l'arrêt de l'exercice. Cette augmentation persistait chez les PTD mais pas chez les sujets sains pendant la récupération (616). De plus, l'activité de la GPx n'était pas influencée par l'exercice aigu chez les PTD alors qu'elle augmentait chez les sujets HbAA (616). Il semblerait donc que dans certains cas les PTD puissent présenter, en réponse à un exercice, une production plus

importante de  $H_2O_2$  par la SOD dont l'activité augmente. L'absence d'augmentation de l'activité de la GPx pourrait alors entraîner une moindre dégradation de  $H_2O_2$  et donc augmenter la production de ROS. Ces conclusions sont cependant à confirmer avec d'autres études.

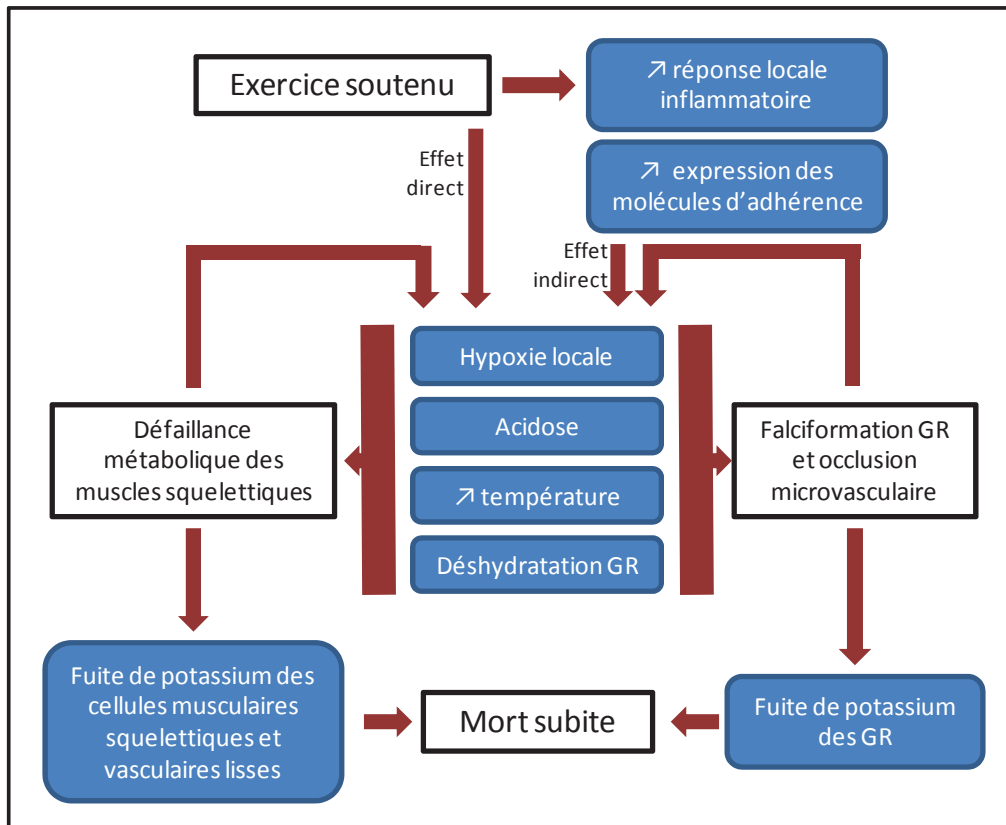
Du point de vue de la biodisponibilité du NO, les concentrations en NOx et nitrotyrosine ne diffèrent pas entre PTD et sujets HbAA au repos (612,614-615). En réponse à un exercice incrémental et maximal, les concentrations plasmatiques en NOx n'augmentent ni ne diffèrent entre PTD et sujets HbAA. Cependant, les concentrations en nitrotyrosine augmentent chez les PTD mais pas chez les HbAA (614). Lorsque les sujets PTD porteur de l' $\alpha$ -thalassémie sont exclus, le même type d'exercice incrémental provoque une diminution des NOx immédiatement après l'arrêt de l'exercice chez les PTD comparés aux sujets HbAA et la nitrotyrosine ne varie pas entre les deux groupes (615). Enfin, l'exercice sous maximale ne semble pas influencer les concentrations en NOx chez les PTD et HbAA (612). Ainsi, un exercice maximal pourrait provoquer une baisse de la biodisponibilité du NO chez les PTD (615), ce qui n'est pas le cas d'un exercice sous maximal (612).

L'étude de la cascade de coagulation chez les PTD par Beltan et al. suggère que les PTD et les HbAA ne présentent pas de différence dans l'activation de la coagulation au repos et observe même que les PTD présentent une moindre activation de la cascade de coagulation en réponse à l'exercice (617).

Ainsi, les PTD semblent présenter, en réponse à l'exercice, des anomalies hémorhéologiques, d'activation endothéliale (via les molécules d'adhérence solubles) ainsi qu'une élévation du stress oxydatif probablement liée à une diminution des défenses antioxydantes. Toutes ces altérations semblent susceptibles de majorer le risque d'adhérence endothéliale et/ou de crise vaso-occlusive. Elles pourraient alors expliquer, au moins en partie, la fréquence plus élevée des accidents vaso-occlusifs observée chez les PTD suite à un exercice physique aigu. Il en résulte la suggestion de Ajayi de reclassifier le trait drépanocytaire comme un état pathologique et non comme un phénotype bénin et asymptomatique (115).

Enfin, une revue de littérature récente suggère que les morts subites observées chez les PTD pourraient être la conséquence d'une hyperkaliémie (618). Celle-ci serait causée par l'exercice aigu stimulant l'hypoxie locale, l'acidose, l'hyperthermie et la déshydratation des

GR, qui eux-mêmes entraineraient une défaillance métabolique des muscles squelettiques ainsi qu'une falciformation des GR et des occlusions vasculaires. La conséquence étant une fuite de potassium des GR, des muscles squelettiques et des CMLV, qui iraient se concentrer au niveau plasmatique et causer les défaillances menant à la mort subite (figure 24) (618). Cette hypothèse nécessite cependant d'être vérifiée mais il a tout de même été observé que dans certains cas de mort subite chez les PTD, les concentrations en potassium étaient élevées (618).



**Figure 24 : Mort subite et drépanocytose, l'hypothèse de l'hyperkaliémie.**  
Figure traduite de Loosemore et al. (618)

## II.2. EXERCICE AIGU ET/OU CHRONIQUE CHEZ LES SUJETS DREPANOCYTAIRES HOMOZYGOTES

### II.2.i. L'EXERCICE AIGU COMME OUTIL DE DIAGNOSTIC

L'exercice aigu est avant tout utilisé chez les drépanocytaires comme outil de diagnostic de certaines symptomatologies développées en réponse à la mutation HbS. Il existe, entre autre, un test fréquemment utilisé appelé « test de marche de 6 minutes » qui consiste à réaliser pendant 6 min une marche dans un couloir de 30m de long en moyenne (619). La comparaison de la distance parcourue entre deux tests permet de fournir

des indications sur l'effet d'une intervention thérapeutique ou bien sur la récupération d'une opération par des tests pré/post (619). Il s'agit de plus d'un test fiable et reproductible avec un faible coefficient de variation (619).

Chez les patients drépanocytaires, ce test est fréquemment utilisé dans des études comme indicateur d'une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Une corrélation négative entre une diminution de la distance au test de marche et l'augmentation de la vélocité de régurgitation tricuspide (VRT) est en effet fréquemment observée (620-623). Ce dernier marqueur (VRT) correspond à une augmentation de la pression systolique dans l'artère pulmonaire et tend à révéler un facteur de risque pour l'HTAP lorsqu'elle est supérieure à 3 m/s (624). De plus, le test de marche, couplé à des analyses spirométriques, permet aussi de mettre en évidence des problèmes respiratoires tels que l'asthme, l'hyperréactivité des bronches (625) ou bien encore un défaut dans la diffusion pulmonaire du monoxyde de carbone impliquée dans les dyspnées (626). Enfin quelques études ont utilisé ce test de marche en pré/post intervention pour évaluer l'effet d'un médicament sur l'amélioration de l'état de santé des drépanocytaires (627-629).

#### **II.2.ii. REPONSE A L'EXERCICE AIGU ET CHRONIQUE CHEZ LES SUJETS DREPANOCYTAIRES HOMOZYGOTES**

La réponse à l'exercice aigu des sujets drépanocytaires homozygotes est relativement peu étudiée. Cela s'explique probablement par les risques de crise vaso-occlusive encourus par le patient si la session d'exercice est inadaptée. Il existe cependant des études menées sur des patients présentant une absence ou peu de complication de la maladie soumis à un exercice aigu, généralement sous maximale. Ils observent que :

❖ L'exercice sous-maximal de 20min n'affecte pas l'hématocrite, la viscosité sanguine et les marqueurs de la cascade de coagulation tels que le fibrinogène et la prothrombine. En revanche, une augmentation de la proportion de GR denses couplée avec une baisse des GR moins denses a été observée chez les patients drépanocytaires en réponse à ce type d'exercice. Ces changements hématologiques ne sont cependant pas accompagnés de désordres cliniques et de complication médicale (630). Cette augmentation de la proportion de GR denses suite à l'exercice confirme une étude assez ancienne de Platt qui montrait que, suite à un exercice consistant à monter lentement 4 étages d'escalier, les

sujets drépanocytaires présentaient une hémolyse accrue. Celle-ci serait due à la présence de GR déshydratés beaucoup plus sensibles à la lyse cellulaire (631) ;

❖ L'exercice peut être associé à des altérations cardio-ventilatoires chez les sujets drépanocytaires: suite à un exercice sous-maximal de 3 à 5 min, le segment ST est déprimé chez les sujets HbSS ayant des concentrations en Hb <8,5 g/dl, suggérant une baisse de l'approvisionnement en oxygène du myocarde. Cette baisse est certainement causée par une diminution de la concentration en Hb des GR, ce qui diminue la quantité d'O<sub>2</sub> transporté. Cette hypothèse semble validée par le fait que seuls les sujets HbSS ayant des concentrations en Hb inférieur à 8,5g/dl présentent une dépression du segment ST (632). De plus, pour le même type d'exercice, Pianosi et al. ont montré une augmentation de la réponse ventilatoire chez les sujets HbSS causée par une augmentation de l'espace mort alvéolaire. Cela serait aussi dû à de plus faibles concentrations en Hb, ce qui diminuerait la quantité d'O<sub>2</sub> pris en charge au niveau des capillaires pulmonaires (633).

Les sujets drépanocytaires présentent, en outre, des performances sportives inférieures à celles des sujets HbAA avec, pour un exercice de même intensité, un stress physiologique accru qui cause une augmentation de la fréquence cardiaque, ventilatoire, des concentrations en lactate (630,634) et une baisse de la saturation artérielle en oxygène (635). En outre, plus la distance à parcourir est importante, plus les écarts de performances se creusent entre sujets HbAA et HbSS (636). Ces performances limitées chez les sujets drépanocytaires pourraient s'expliquer par une puissance maximale aérobie inférieure causée par la pathologie ainsi qu'une activité physique habituelle moins importante que chez les sujets sains (630). L'étude de Sachdev et al. rapporte cependant que la distance au test de marche est corrélée négativement aux concentrations en ferritine (molécule piégeant le fer libre et donc marqueur d'hémolyse) et à une fréquences d'épisodes douloureux supérieurs à 2/an (620). Ainsi, ces plus faibles performances observées chez les sujets HbSS pourraient aussi être la conséquence de la présence d'HbS et des complications qu'elle induit sur l'organisme des patients. La désaturation de l'HbS plus importante, leurs plus faibles concentrations en Hb, l'anémies chroniques, les syndromes thoraciques aigus ayant altéré la fonction pulmonaire ou les micro-occlusions vasculaires pouvant ralentir l'oxygénation tissulaire pourraient expliquer cela (585,637).

Les exercices de faible durée et/ou d'intensité adaptée aux capacités des patients semblent être cependant bien tolérés par les patients qui ne présentent pas de complications suite à ces tests (172,630,634). En effet, les concentrations en TNF- $\alpha$ , CRP, IL-6 et ET-1 ne semblent pas être influencées par 30 min de marche sur tapis roulant à 65-75% de la fréquence cardiaque maximale tandis que la NOx augmente en réponse à un exercice sous-maximal chez les sujets HbSS mais pas chez les HbAA suggérant une augmentation du NO disponible pour la vasodilatation (172).

Enfin, deux études ont mené des sessions de réhabilitation par l'activité physique chez des patients drépanocytaires hospitalisés pour des crises vaso-occlusives. La première étude rapporte une diminution de la durée d'hospitalisation faisant suite à une CVO (comparé à la durée de la dernière hospitalisation pour le même patient) ainsi qu'une diminution de la quantité d'analgésique prescrite suite à des sessions de fluidothérapie, des exercices d'endurance et des étirements (638). L'autre étude a porté sur l'observation, chez une femme drépanocytaire, des effets de 5 semaines d'exercices (aérobie, en eau chaude, étirements et relaxation) à raison de 2 sessions par semaine. Une diminution des douleurs a été rapportée, ainsi qu'un meilleur étirement des muscles respiratoires et une meilleure qualité de vie (639). Bien que ces études souffrent de limites méthodologiques importantes, il se pourrait donc que des sessions d'activité physique, menées dans un cadre médical strict et encadré, puissent favoriser la récupération des patients drépanocytaires suite à des CVO.

# **C. Contribution**

## **Personnelle**

---

## Hypothèse et problématique

---

Cela fait maintenant quelques décennies que la thématique activité physique aigue et sujets porteurs d'HbS homozygotes ou hétérozygotes a fait son apparition dans la littérature scientifique. Ces études ont essentiellement utilisé l'exercice aigue comme un outil de diagnostique chez les sujets drépanocytaires homozygotes et pour mieux comprendre les accidents/morts subites à l'effort observés chez les sujets PTD. Elles ont, de plus, permis de mettre en avant des dysfonctionnements dans la réponse à l'exercice de ces sujets porteurs d'HbS. Chez les sujets PTD, bien que l'exercice soit très bien toléré, une augmentation de la falciformation des GR en altitude (606,608), des dysfonctionnements hémorhéologiques et circulatoires (117,124,610-612), une augmentation des dysfonctions endothéliales – augmentation de sVCAM-1 (121-122), diminution de NOx (615) – et enfin des augmentations possibles du stress oxydatif (614-615) ont été rapportés. Chez les sujets drépanocytaires, l'exercice aigue sous-maximal conduit à une augmentation de la proportion des GR denses (630), à une hémolyse accrue (631), à une baisse de l'approvisionnement en O<sub>2</sub> du myocarde lorsque les concentrations en Hb sont trop faible (632), ainsi qu'à une augmentation de la réponse ventilatoire (633). De plus, la connaissance des mécanismes vaso-occlusifs permet de se rendre compte qu'un exercice aigue trop intense, en stimulant l'inflammation, le stress-oxydatif, l'adhésion vasculaire et la coagulation sanguine (cf. A. partie 4), peut rapidement conduire à provoquer la mise en place d'occlusions vasculaires (figure 19). Ainsi, toutes ces constatations rendent plus compréhensible l'absence de recommandations en faveur d'une activité physique régulière chez les sujets drépanocytaires.

Cependant, comme a permis de le démontrer la revue de littérature portant sur les effets de l'entraînement chez des sujets sains et atteints de pathologies non drépanocytaires (cf. A. partie 4), il semblerait qu'une activité physique régulière puisse :

- ❖ augmenter les défenses antioxydantes et donc diminuer le stress oxydatif ;
- ❖ cette baisse du stress-oxydatif semble avoir des répercussions positives sur la biodisponibilité du NO et pourrait limiter l'expression des molécules d'adhérence vasculaire par une moindre stimulation de la voie NFκB ;



- ❖ stimuler les mécanismes anti-inflammatoires induisant la libération de cytokines anti-inflammatoires telles que IL-10 ou IL-1ra ;
- ❖ limiter la coagulation sanguine et la formation de thrombus.

**Ainsi, ce travail de thèse repose sur l'hypothèse qu'en limitant certains facteurs participant à la mise en place des crises vaso-occlusives drépanocytaires (inflammation, adhésion vasculaire, stress-oxydatif, coagulation, modulation anormale du tonus vasculaire, falciformation), l'activité physique régulière pourrait être bénéfique à ces sujets en diminuant l'occurrence et/ou l'importance de ces crises.**

Cette hypothèse est résumée dans la figure 25 qui permet de discerner les points pouvant être limités par l'activité physique régulière dans le mécanisme de la CVO et qui a servi de base de travail à nos études.

---

Afin d'apporter des éléments de réponses à cette hypothèse, plusieurs études ont été menées:

- ❖ **Etude n°1** : elle a eu pour but de réaliser une première approche dans le domaine de la drépanocytose et de l'entraînement et d'observer si la réponse endothéliale à un exercice aigu pouvait être modifiée par l'activité physique régulière. Pour cela, le choix s'est porté sur une population de PTD afin de pouvoir disposer d'une population déjà entraînée et ne présentant pas de contre-indication à la pratique sportive tout en étant porteuse de la mutation HbS. L'évolution des molécules plasmatiques sVCAM-1, sICAM-1, sP- et sE-sélectine et des molécules de l'inflammation a été observée avant et après un exercice incrémental et maximal sur bicyclette ergométrique chez des sujets sains et PTD, sédentaires ou entraînés.



❖ **Etudes n°2-3-4** : ces études ont toutes les trois été effectuées sur des souris avec comme but final de procéder à une investigation plus poussée des effets de l'entraînement sur les mécanismes pouvant conduire aux crises vaso-occlusives. Pour cela, notre choix s'est porté sur un modèle de souris transgénique drépanocytaire SAD chez qui nous avons testé les effets d'une session de 8 semaines d'activité physique volontaire en roue d'activité sur les réponses induites par un stress d'hypoxie/réoxygénation (étude 4). Cette étude a nécessité des pré-expérimentations (étude 2 et 3) décrites ci-dessous et a ainsi donné lieu à trois publications acceptées ou à soumettre.

➤ **Etude n°2** : cette étude a permis de tester un protocole d'activité physique régulière en roue d'activité volontaire sur des souris C57Bl/6. Le but était de vérifier que ce protocole induisait bien des modifications anatomiques et fonctionnelles dans le cœur ainsi qu'enzymatiques dans les muscles, comme cela est le cas chez les athlètes soumis à un entraînement physique régulier. Pour cela, nous avons fait appel à la technique d'imagerie à résonance magnétique nucléaire (IRM) pour obtenir des images cardiaques, ainsi qu'à des analyses *ex vivo*, notamment des mesures enzymatiques musculaires.

➤ **Etude n°3** : cette étude a permis de tester la réponse du modèle de souris drépanocytaire SAD à un stress d'hypoxie/réoxygénation sensé stimuler les occlusions vasculaires. Le but était alors de disposer de marqueurs moléculaires de la crise vaso-occlusive afin d'y tester les effets du protocole d'activité physique volontaire. Les mécanismes observés concernaient essentiellement l'adhérence vasculaire avec l'observation de l'expression endothéliale de VCAM-1, le stress-oxydatif, l'inflammation, des marqueurs de la coagulation et des molécules impliquées dans la modulation du tonus vasculaire en réponse ou non à ce stress d'H/R chez des souris C57Bl/6 et SAD.

➤ **Etude n°4** : grâce aux deux publications précédentes, nous disposions de protocoles d'activité physique volontaire et d'H/R validés. Cela a permis de déterminer si la réponse endothéliale à ce stress vaso-occlusif pouvait être limitée chez les souris SAD physiquement actives en comparaison à celles n'ayant pas bénéficié de roue d'activité. Pour cela, des marqueurs de l'adhérence vasculaire (VCAM-1), du stress-oxydatif (MDA, AOPP, GPx, SAD et catalase) et de l'hémolyse (LDH) ont été étudiés chez les souris C57Bl/6 ou SAD soumises ou non à la roue d'activité et au stress d'H/R.

## **Etude n°1 : Activité physique régulière et activation endothéliale chez les porteurs du trait drépanocytaire**

---

E. Aufradet, G. Monchanin, S. Oyonno-Engelle, L. Feasson, L. Messonnier, A. Francina, L. Bezin, L.D. Serpero, D. Gozal, M. Dodogba, D. Wouassi, V. Banimbeck, B. Djoda, P. Thiriet et C. Martin.

Publié dans *Medicine and Science in Sports and Exercise* en 2010.

Volume 42; pages 1987-1994.

---

Cet article fait suite aux études réalisées au laboratoire par Monchanin et al. portant sur les effets de l'exercice aigu chez des sujets PTD (121-122). Il y était rapporté qu'en réponse à un exercice aigu incrémental et maximal ou endurant (60min à 70% de la puissance maximale), les sujets PTD présentaient des concentrations en molécules solubles d'adhésion sVCAM-1 supérieures à celles des sujets sains et ce aussi bien au repos qu'en réponse à l'exercice ou pendant les 24 premières heures de récupération. Ainsi, les PTD pourraient présenter des dysfonctionnements dans l'adhérence vasculaire qui pourraient favoriser la formation d'agrégats cellulaires et donc des perturbations microcirculatoires en réponse à l'exercice.

Dans ce contexte, les sujets PTD apparaissaient comme une population intéressante pour tester l'hypothèse d'un effet bénéfique de l'entraînement sur les paramètres d'adhérence vasculaire puisque ceux-ci étaient augmentés chez ces sujets. Ainsi, pour cette étude, des sujets PTD et sains entraînés et sédentaires ont été recrutés. L'analyse plasmatique des molécules solubles d'adhérence vasculaire (sVCAM-1, sICAM-1, sP-sélectine et sE-sélectine) ainsi qu'inflammatoire (IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ ) a été effectuée au repos comme en réponse à un exercice incrémental et maximal. Les résultats montrent que les sujets PTD entraînés présentent des concentrations en sVCAM-1 significativement inférieures à celles des sujets PTD sédentaires et similaires à celles des sujets sains. Ces résultats se vérifient au repos comme en réponse à l'exercice aigu. De plus, les concentrations plasmatiques en sP-sélectine augmentent, en réponse à l'exercice maximal, seulement chez les sujets sédentaires. Les autres molécules solubles d'adhérence vasculaire ainsi qu'inflammatoire ne sont pas différentes entre PTD sédentaires et entraînés. Ces résultats suggèrent que l'activité physique régulière pourrait limiter l'activation endothéliale,

voire l'expression endothéliale de VCAM-1, dont sVCAM-1 est considéré comme le reflet plasmatique, en réponse à un exercice aigu chez les sujets PTD.

Ces résultats sont complétés par une autre étude menée au laboratoire par Chirico et al. (Annexe 1) du point de vue du stress-oxydatif et reposant sur les mêmes sujets et échantillons plasmatiques. Dans cette étude, les oxydations lipidiques (MDA exprimé en pourcentage des valeurs de repos) et protéiques (AOPP et protéines carbonylées) sont supérieures chez les sujets PTD sédentaires comparées à celles des PTD entraînés et sains en réponse à l'exercice aigu. En parallèle, les activités antioxydantes de la SOD (en réponse à l'exercice) et de la GPx (1h après l'arrêt de l'exercice) sont supérieures chez les sujets entraînés par rapport à celles des sujets sédentaires. Enfin, la biodisponibilité du NO semble améliorée chez les sujets PTD entraînés puisque les concentrations de NOx sont supérieures à celles des sédentaires et les concentrations de nitrotyrosine sont inférieures chez les PTD entraînés par rapport à celles des PTD sédentaires.

Ces deux études présentent ainsi des conclusions similaires sur les effets de l'entraînement sur la réponse à un exercice aigu maximal chez des sujets PTD. La première étude a en effet montré une possible limitation de l'expression de VCAM-1 chez les PTD entraînés tandis que la deuxième étude tend à montrer que l'entraînement physique pourrait limiter le stress oxydatif grâce entre autre à une amélioration des capacités antioxydantes. Cela pourrait ainsi avoir des répercussions positives sur la réponse à l'exercice des PTD entraînés en améliorant la biodisponibilité du NO et en limitant l'activation endothéliale (dont VCAM-1) via une moindre stimulation de NFκB par le stress-oxydatif. Ainsi, bien que ne présentant pas de contre-indications à la pratique sportive ni de CVO en réponse à l'exercice aigu – sauf rare cas d'accident – comme c'est le cas chez les sujets drépanocytaires homozygotes, les sujets PTD physiquement entraînés semblent bénéficier d'adaptations physiologiques susceptibles de limiter le déclenchement de plusieurs facteurs impliqués dans les CVO. Ces résultats vont donc dans le sens de l'hypothèse formulée dans cette thèse et nécessitent maintenant d'être approfondis dans un protocole incluant un modèle plus sévère pouvant présenter la formation d'occlusions vasculaires.

# Habitual Physical Activity and Endothelial Activation in Sickle Cell Trait Carriers

EMELINE AUFRADET<sup>1</sup>, GÉRALDINE MONCHANIN<sup>1</sup>, SAMUEL OYONNO-ENGELLE<sup>2</sup>, LÉONARD FEASSON<sup>3</sup>, LAURENT MESSONNIER<sup>4</sup>, ALAIN FRANCINA<sup>5</sup>, LAURENT BEZIN<sup>6</sup>, LAURA D. SERPERO<sup>7</sup>, DAVID GOZAL<sup>8</sup>, MACIAS DODOGBA<sup>9</sup>, DIEUDONNÉ WOUASSI<sup>9</sup>, VIVIANE BANIMBECK<sup>2</sup>, BERNARD DJODA<sup>9</sup>, PATRICE THIRIET<sup>1</sup>, and CYRIL MARTIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center of Research and Innovation on Sports, University Claude Bernard of Lyon 1, University of Lyon, Lyon, FRANCE; <sup>2</sup>Laboratory of Physiology, Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, University of Yaoundé I, Yaoundé, CAMEROON; <sup>3</sup>Laboratory of Exercise Physiology, University Jean Monnet of Saint Etienne, Saint Etienne, FRANCE; <sup>4</sup>Laboratory of Exercise Physiology, University of Savoie, Chambéry, FRANCE; <sup>5</sup>Unit of Hemoglobin Molecular Pathology, Edouard Herriot Hospital, Lyon, FRANCE; <sup>6</sup>Cellular and Molecular Integrative Physiology, University Claude Bernard of Lyon 1, University of Lyon, Lyon, FRANCE; <sup>7</sup>Department of Pediatrics, University of Louisville, Louisville, KY; <sup>8</sup>Department of Pediatrics, University of Chicago, Chicago, IL; and <sup>9</sup>National Institute of Youth and Sports, Yaoundé, CAMEROON

## ABSTRACT

AUFRADET, E., G. MONCHANIN, S. OYONNO-ENGELLE, L. FEASSON, L. MESSONNIER, A. FRANCINA, L. BEZIN, L. D. SERPERO, D. GOZAL, M. DODOGBA, D. WOUASSI, V. BANIMBECK, B. DJODA, P. THIRIET, and C. MARTIN. Habitual Physical Activity and Endothelial Activation in Sickle Cell Trait Carriers. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Vol. 42, No. 11, pp. 1987–1994, 2010. **Purpose:** It remains unclear whether habitual physical activity in sickle cell trait (SCT) carriers modulates the levels of resting and postexercise vascular adhesion and inflammatory molecules. **Methods:** Plasma levels of pro-inflammatory (interleukin (IL)-4, IL-5, IL-8, sCD40L, and tumor necrosis factor  $\alpha$ ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines and adhesion molecules (soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), sP-selectin, or sE-selectin) were assessed at rest and in response to an incremental exercise to exhaustion in untrained (UT: no regular physical activity) and trained (T: soccer players, 8 h·wk<sup>-1</sup> minimum) SCT and control (CON) subjects ( $n = 8$  per group; age = 23.5  $\pm$  0.35 yr). **Results:** sVCAM-1 levels were significantly higher in the UT-SCT group than that in T-SCT group (+43.5%) at rest, at the end, and at 1, 2, and 24 h after the end of the exercise. For the other molecules, no differences emerged among the groups at rest, but in response to exercise plasma, sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin, and sCD40L increased in all groups, and sP-selectin only increased in the UT group. All values that increased with the acute exercise returned to their respective baseline levels 1 h after the end of the exercise. **Conclusions:** A physically active lifestyle in SCT carriers may decrease endothelial activation and may limit the risk for vascular adhesion events in the microcirculation of SCT subjects. **Key Words:** VASCULAR CELL ADHESION MOLECULES, CYTOKINES, SELECTINS, MAXIMAL EXERCISE, HEMOGLOBINOPATHY

Sickle cell disease (SCD) is the most common genetic disease in the world and is caused by a unique mutation in the sixth codon of the  $\beta$ -globin gene (hemoglobin A (HbA) into hemoglobin S (HbS)) (31). This mutation leads to polymerization of HbS and to sickling of red blood cells (RBC) in response to physical stresses such as hypoxia, acidosis, dehydration, or hyperthermia (20).

Recurrent painful vaso-occlusive crises because of an accumulation of low deformable RBC in the microcirculation are among the major symptoms of the SCD (20). In SCD, the severity of these crises is related to endothelial dysfunction. SCD endothelium is characterized by a higher expression of vascular adhesion molecules (namely, endothelial activation), the most important being vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin, and P-selectin (23). This activation is mediated by some pro-inflammatory cytokines such as interleukin-8 (IL-8), which mediates the inflammation through enhanced leukocyte adhesion (23), or tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), which up-regulates the expression of VCAM-1 (23).

Sickle cell trait (SCT), the heterozygous form of SCD, is characterized by <45% of HbS. Although SCT is usually asymptomatic and usually considered a benign condition (29), an increasing number of studies have reported diminished exercise tolerance (13), impaired RBC deformability (26),

Address for correspondence: Cyril Martin, Ph.D., Centre de Recherche et d'Innovation sur le Sport (CRIS EA647), Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Campus La Doua, Bat Raphael Dubois, 27-29 bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France; E-mail: cyril.martin@univ-lyon1.fr.

Submitted for publication July 2009.

Accepted for publication March 2010.

0195-9131/10/4211-1987/0

MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE®

Copyright © 2010 by the American College of Sports Medicine

DOI: 10.1249/MSS.0b013e3181e054d6



existence of hypercoagulable states (41), and higher circulating levels of adhesion molecules in basal conditions and in response to exercise among SCT carriers (27,28). Some authors have in fact recently proposed to reclassify the SCT as a disease (3) because in some circumstances, such as physical exercise or hypoxic stress, SCT subjects may develop vaso-occlusive painful crises and other complications that can ultimately lead to death (11).

Soluble VCAM-1 (sVCAM-1) is the plasma circulating form of VCAM-1 and reflects endothelial activation (34). Monchanin et al. recently reported that SCT carriers exhibit a higher level of plasma sVCAM-1 at rest and during recovery from a progressive and maximal exercise (27) or endurance exercise (28) compared with normal hemoglobin (HbAA) subjects. The endothelial activation and the potential existence of underlying vascular dysfunction raised further questions about the risk for blood cells/endothelium interactions and for vaso-occlusive events during and several hours after exercise. Indeed, several studies have shown that exercise training improves endothelial function in healthy men (9) as well as in patients with chronic heart failure (1,2) or type 2 diabetes (43). The beneficial roles of physical training were further demonstrated by significant reductions in circulating levels of major inflammatory cytokines (1), soluble ICAM-1 (sICAM-1) (43), and sVCAM-1 (2). However, we are not aware of any studies on the effects of regular physical activity on circulating pro-inflammatory cytokines and soluble vascular adhesion molecules in SCT carriers. On the basis of aforementioned considerations, we hypothesized that endothelial activation/inflammation would be attenuated by physical activity in SCT carriers that consequently should reduce the risks for vascular adhesion and for the potential vaso-occlusive pathologies sometimes observed in this population. To test this hypothesis, the aim of this study was therefore to investigate whether habitual physical activity affects the plasma levels of pro-inflammatory (IL-4, IL-5, IL-8, and TNF- $\alpha$ ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines, sCD40L, and adhesion molecules (sVCAM-1, sICAM-1, sP-selectin, or sE-selectin) at rest and in response to a progressive and maximal exercise in SCT carriers.

## METHODS

**Subjects.** The study population consisted of 16 SCT carriers (HbAS, SCT, 34.5% HbS  $\pm$  0.81) and 16 subjects with normal Hb (HbAA, CON). Subjects were male students of the University of Yaoundé II (Soa, Cameroon). Each group was divided into two subgroups on the basis of their habitual physical activity: eight CON and eight SCT who did not engage in regular physical activity for the two preceding years were assigned to "untrained" (UT) subgroups (eight UT-CON and eight UNT-SCT). Eight CON and eight SCT who practiced soccer regularly (8 h $\cdot$ wk<sup>-1</sup> minimum for several years) were included in the "trained" (T) subgroups (eight T-CON and eight T-SCT). All the subjects were volunteers and gave their written informed con-

sent before participation in the study. The definite enrolment of the subjects took place only after a complete medical examination, including height and weight measurements and a venous blood test to detect SCT and HIV. Exclusion criteria included the presence of known chronic disease (hypertension, HIV), stroke, or recent malaria crisis. SCT subjects did not report previous sickle cell crisis or other incident related to their hemoglobinopathy.

**Protocol and exercise test.** The protocol was approved by the local ethics committee of Cameroon and was in accordance with the guidelines set by the Declaration of Helsinki. All the experiments took place at the General Hospital of Yaoundé (Cameroon). The day before the exercise test, the subjects were asked to avoid strenuous exercise. On the experimental day, all subjects performed an incremental maximal test exercise on a cycle ergometer (Monark, 818E, Stockholm, Sweden). The test began after a 5-min warm-up at 30 W. The initial 70-W work rate was increased every 3 min by 35-W steps until volitional exhaustion and therefore allowed assessment of the maximal aerobic power (MAP; W) and HR<sub>max</sub> (beats $\cdot$ min<sup>-1</sup>). HR was displayed throughout the incremental exercise using a chest belt (Polar Electro, Kempele, Finland). MAP was determined by linear interpolation from the HR versus work rate curve. Blood samples were drawn from a catheterized antecubital vein of the nondominant arm and collected at rest ( $T_{rest}$ ), immediately at the end of the exercise test ( $T_{ex}$ ), and after 1, 2, and 24 h of recovery ( $T_{1h}$ ,  $T_{2h}$ ,  $T_{24h}$ , respectively) in EDTA tubes. The samples were used to measure levels of blood cells (at rest), soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sICAM-1, sP-selectin, and sE-selectin), sCD40L, and cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-8, and IL-10) at all blood sampling time points.

**SCT confirmation,  $\alpha$ -thalassemia detection, and hematological parameters.** For SCT confirmation, blood samples were collected in the EDTA tubes at rest, and the various Hb were isolated and quantified by ion-exchange high-performance liquid chromatography (Variant I, Beta Thal Short Program; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Positive test results for SCT were determined by the presence of HbS but <50% of the total Hb. To study the coexistent presence of  $\alpha$ -thalassemia, the technique described by Chong et al. (7) was used. The only form of  $\alpha$ -thalassemia found in some SCT carriers was the heterozygous one marked by a depletion of 3.7 kb of DNA, containing one of the two linked  $\alpha$ -globin genes ( $\alpha\alpha/\alpha^{-3.7}$ ). Blood for the hematological measurements was sampled at rest in EDTA tubes and was analyzed using a hematology analyzer (Abbott Cell Dyn 1800 hematology analyzer; Block Scientific, Bohemia, NY).

**Adhesion molecules and cytokines assessment.** The blood samples collected at  $T_{rest}$ ,  $T_{ex}$ ,  $T_{1h}$ ,  $T_{2h}$ , and  $T_{24h}$  were centrifuged, and plasma was aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. The measurements of plasma sVCAM-1, sICAM-1, sE-selectin, and sP-selectin were done with the use of enzyme-linked immunosorbent assay kits

(Diacclone Systems, Besançon, France) according to the manufacturer's instructions. All samples were determined in triplicate, and the sensitivity limits were 0.6 ng·mL<sup>-1</sup> (sVCAM-1), 0.1 mg·mL<sup>-1</sup> (sICAM-1), 0.5 ng·mL<sup>-1</sup> (sE-selectin), and 1.06 ng·mL<sup>-1</sup> (sP-selectin). Cytokines were quantified at  $T_{rest}$ ,  $T_{ex}$ , and  $T_{2h}$  using a Luminex<sup>®</sup> fluorescent bead-based immunoassay kit (Luminex Corporation, Austin, TX) to simultaneously measure interleukin (IL)-4, IL-5, IL-8, IL-10, sCD40L, and TNF- $\alpha$ . The R&D Fluorokine MAP Human Cytokine Multiplex Panel was used for this purpose (R&D Systems, Minneapolis, MN). The detection limits were 1, 4, 4, 1, 16, 64, and 1 pg·mL<sup>-1</sup>, respectively.

**Statistics.** Results are expressed as means  $\pm$  SE and analyzed with Statistica (Version 5.5; StatSoft, Tulsa, OK). The anthropometric characteristics, the hematologic findings, the HR<sub>max</sub>, and the MAP were compared using two-way ANOVA procedures followed by *post hoc* tests (UT/T and CON/SCT). Plasma levels of soluble adhesion molecules and cytokines were compared between the four groups and at different times using two-way ANOVA with repeated measurements followed by *post hoc* tests. Paired *t*-tests were used when appropriate to determine where significant differences occurred. Differences between values were considered to be statistically significant for  $P \leq 0.05$ .

## RESULTS

**Anthropometric, hematologic, and MAP characteristics.** As shown in Table 1, although the age was not different among the four groups, UT-CON subjects were significantly shorter than UT-SCT and T-CON subjects and significantly lighter than that in the three other groups ( $P < 0.05$ ). In addition, UT-SCT subjects' height was significantly higher than that in the T-SCT group ( $P < 0.05$ ). The HR<sub>max</sub> values and the hematologic parameters were similar among the four groups, except for the following: i) the mean corpuscular volume was significantly

lower in the SCT groups than that in their CON counterparts, and ii) the platelet concentrations were significantly higher in the T groups compared with the UT subjects ( $P < 0.05$ ). A coexistent  $\alpha$ -thalassemia was detected in three UT-SCT and in five T-SCT subjects. MAP (W) and relative MAP (W·kg<sup>-1</sup>) were significantly higher in T subjects than that in their UT counterparts ( $215.05 \pm 7.0$  W vs  $174.9 \pm 6.2$  W,  $P < 0.001$ , and  $3.2 \pm 0.09$  vs  $2.74 \pm 0.09$  W·kg<sup>-1</sup>,  $P < 0.005$ , respectively).

**Plasma cytokines and soluble adhesion molecules at rest and after maximal exercise.** The plasma concentrations of IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, or TNF- $\alpha$  did not significantly differ at rest and after the incremental exercise between the four groups (Table 2). Furthermore, no significant variations in these cytokines concentrations were obtained at  $T_{ex}$  and  $T_{2h}$  compared with  $T_{rest}$ . Although no significant intergroup differences were observed, sCD40 ligand concentrations were significantly increased at  $T_{ex}$  compared with  $T_{rest}$  and  $T_{2h}$  in all the subjects ( $+59.7\%$ ,  $P < 0.05$ ) (Table 2).

Basal plasma concentrations of sICAM-1, sP-selectin, and sE-selectin were not statistically different among the four groups (Table 3). For sVCAM-1, ANOVA revealed that UT-SCT subjects exhibited higher concentrations than their T counterparts ( $1738 \pm 98$  vs  $1248 \pm 131$  ng·mL<sup>-1</sup>, respectively,  $P < 0.05$ ; Fig. 1). This was also the case at  $T_{ex}$  and  $T_{1h}$ ,  $T_{2h}$ , and  $T_{24h}$ .

Furthermore, sVCAM-1 plasma concentrations were significantly more elevated in UT-SCT than that in UT-CON ( $P < 0.05$ ; Fig. 1), whereas no significant difference was observed between T-SCT and T-CON subjects ( $P = 0.89$ ). Plasma sICAM-1, sVCAM-1, and sE-selectin increased significantly in all groups at the end of the strenuous exercise as compared with resting levels ( $+8.2\%$ ,  $+12.0\%$ , and  $+12.2\%$ , respectively,  $P < 0.05$ ) and returned to their baseline value 1 h after the end of exercise ( $T_{1h}$ ). When plasma sE-selectin concentrations were expressed relative to the resting values,

TABLE 1. Anthropometric, hematologic, and MAP characteristics.

	UT		T	
	CON	SCT	CON	SCT
Age (yr)	22.7 $\pm$ 0.6	23.7 $\pm$ 1.2	24.5 $\pm$ 0.4	23 $\pm$ 0.7
Height (cm)	169 $\pm$ 1.25*	178 $\pm$ 1.81	173.73 $\pm$ 1.65†	172.64 $\pm$ 1.03*
Weight (kg)	60.3 $\pm$ 1.88	68.43 $\pm$ 1.88†	69.18 $\pm$ 1.46†	66.64 $\pm$ 2.02†
WBC ( $10^3$ cells· $\mu$ L <sup>-1</sup> )	5.65 $\pm$ 0.68	4.96 $\pm$ 0.62	5.57 $\pm$ 0.48	5.95 $\pm$ 0.63
Lymphocytes ( $10^3$ cells· $\mu$ L <sup>-1</sup> )	2.87 $\pm$ 0.5	2.49 $\pm$ 0.41	2.59 $\pm$ 0.12	2.65 $\pm$ 0.39
Granulocytes ( $10^3$ cells· $\mu$ L <sup>-1</sup> )	1.93 $\pm$ 0.29	1.56 $\pm$ 0.16	2.14 $\pm$ 0.32	2.46 $\pm$ 0.26
RBC ( $10^6$ cells· $\mu$ L <sup>-1</sup> )	5.23 $\pm$ 0.22	5.38 $\pm$ 0.18	5.12 $\pm$ 0.14	5.46 $\pm$ 0.16
[Hb] (g·dL <sup>-1</sup> )	14.17 $\pm$ 0.49	14.23 $\pm$ 0.3	12.88 $\pm$ 0.87	14.01 $\pm$ 0.3
Hematocrit (%)	44.37 $\pm$ 1.39	43.8 $\pm$ 1.07	42.9 $\pm$ 0.86	42.99 $\pm$ 0.89
MCV (fL)	85.18 $\pm$ 1.44	81.61 $\pm$ 1.6‡	84.04 $\pm$ 1.5	79 $\pm$ 1.15‡
MCH (pg)	27.18 $\pm$ 0.43	26.54 $\pm$ 0.65	27.04 $\pm$ 0.56	25.75 $\pm$ 0.43
Platelets ( $10^3$ cells· $\mu$ L <sup>-1</sup> )	172 $\pm$ 25.54	159.43 $\pm$ 30.02	206.55 $\pm$ 28.7§	266.73 $\pm$ 15.66§
% HbS	—	35.71 $\pm$ 1.15	—	33.73 $\pm$ 1.07
$\alpha$ -Thalassemia	—	3/8	—	5/8
MAP (W)	168.89 $\pm$ 7.9	182.57 $\pm$ 9.7	214.64 $\pm$ 11.25§	215.45 $\pm$ 9.87§
Relative MAP (W·kg <sup>-1</sup> )	2.79 $\pm$ 0.12	2.67 $\pm$ 0.12	3.11 $\pm$ 0.16§	3.23 $\pm$ 0.12§
HR <sub>max</sub> (beats·min <sup>-1</sup> )	185 $\pm$ 5	183 $\pm$ 4	174 $\pm$ 3	189 $\pm$ 4

Values are presented as means  $\pm$  SE.

\* Significant difference from UT-SCT; † significant difference from UT-CON group; ‡ significant difference between the sickle cell trait (SCT) and the control (CON) groups; § significant difference between the UT and the T groups ( $P < 0.05$ ).

WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; [Hb], hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MAP: maximal aerobic power.



TABLE 2. Plasma concentrations of IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , and sCD40L in UT and T CON and SCT subjects at rest, at the end of the incremental exercise test, and after 2 h of recovery.

		$T_{rest}$	$T_{ex}$	$T_{2h}$
IL-4 (pg·mL <sup>-1</sup> )	UT-CON	157.4 ± 66.2	124.8 ± 65.3	168.9 ± 75
	UT-SCT	149.1 ± 54	169.2 ± 68.4	159.5 ± 62.2
	T-CON	212.7 ± 94.9	359 ± 131.2	352.7 ± 124.4
	T-SCT	151.3 ± 50.6	163 ± 63.2	166.4 ± 60.4
IL-5 (pg·mL <sup>-1</sup> )	UT-CON	11.6 ± 6.4	8.6 ± 6.6	7.5 ± 4.1
	UT-SCT	13 ± 7.3	11.4 ± 7.2	14.7 ± 8.5
	T-CON	7.8 ± 5.4	14 ± 7.1	15.1 ± 7.9
	T-SCT	7.4 ± 2.4	6.4 ± 3.6	5.8 ± 3
IL-8 (pg·mL <sup>-1</sup> )	UT-CON	29.7 ± 10.4	27.9 ± 12.2	32.2 ± 12.1
	UT-SCT	46.4 ± 17.2	29.8 ± 14	33.7 ± 11.2
	T-CON	29.2 ± 11.2	56.8 ± 20	43 ± 13.4
	T-SCT	34.2 ± 15.3	41.2 ± 11.8	41.2 ± 12.5
IL-10 (pg·mL <sup>-1</sup> )	UT-CON	55 ± 20.6	36.7 ± 14.9	62 ± 25
	UT-SCT	21.6 ± 1.5	21.7 ± 1.6	22.4 ± 1.9
	T-CON	38.8 ± 14.8	46.7 ± 18.5	42.8 ± 16.5
	T-SCT	45.6 ± 11.7	46.1 ± 14.8	57.4 ± 20.2
TNF $\alpha$ (pg·mL <sup>-1</sup> )	UT-CON	6.9 ± 4.2	7.1 ± 4.2	8.3 ± 5.1
	UT-SCT	15.2 ± 9.6	17.7 ± 11.6	16.2 ± 10.5
	T-CON	8.4 ± 7.3	15.5 ± 8.8	15.2 ± 8.6
	T-SCT	13.1 ± 5.6	12.9 ± 6.5	15.4 ± 6.3
sCD40L (pg·mL <sup>-1</sup> )	UT-CON	3699.1 ± 762.9	6208.1 ± 2510*	4448.5 ± 1124.5
	UT-SCT	3613.3 ± 904.4	4799.8 ± 883.2*	3487.6 ± 729.7
	T-CON	3675.5 ± 1117.1	7884.6 ± 1576.9*	5034.6 ± 977.8
	T-SCT	4317.4 ± 792.1	6217.3 ± 944.4*	5012.8 ± 908.3

Values are presented as means ± SE.

\* Significant difference compared with  $T_{rest}$  and  $T_{2h}$  ( $P < 0.05$ ).

IL, interleukin; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ .

the return to the baseline was confirmed at  $T_{1h}$  in T subjects (Fig. 2), whereas it occurred only 2 h after the end of exercise (i.e., at  $T_{2h}$ ) in UT subjects (Fig. 2).

Although incremental exercise did not statistically change sP-selectin concentrations in the T groups, a significant increase in these concentrations was measured in the UT groups between  $T_{rest}$  and  $T_{ex}$  (+167%,  $P < 0.005$ ). These concentrations returned to basal values 1 h after the end of exercise (Table 3, Fig. 3).

## DISCUSSION

The present study examined whether the training status of CON or SCT subjects affected the plasma concentrations of inflammatory and soluble adhesion molecules at rest and in response to an incremental maximal exercise. The main findings of our study were that 1) sVCAM-1 plasma

concentrations were significantly lower in the T-SCT subgroups compared with the UT-SCT subgroups at rest, immediately ( $T_{ex}$ ), and 1 h ( $T_{1h}$ ), 2 h ( $T_{2h}$ ), and 24 h ( $T_{24h}$ ) after the end of exercise; 2) sP-selectin significantly increased at the end of the exercise in UT, whereas no changes were observed among T group subjects; and 3) the postexercise decrease kinetics of plasma sE-selectin was faster in T than that in UT.

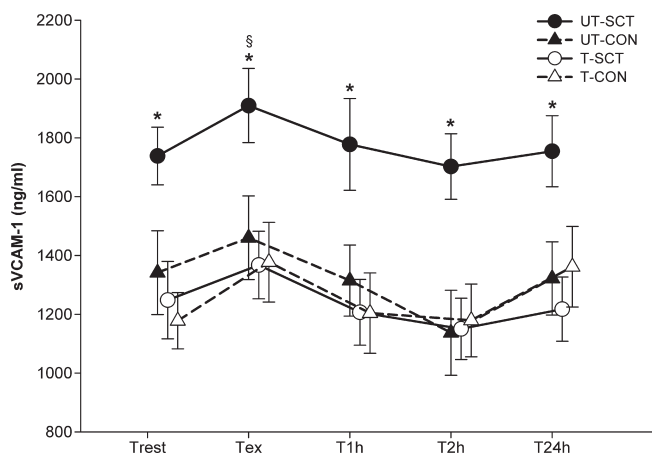
As shown in previous studies (27,28,40), MAP was not different among the SCT and the control subjects. However, MAP was significantly higher in the T group than that in the UT group (+23%,  $P < 0.001$ ). In addition, UT-CON subjects were smaller and lighter by comparison with the three other groups. Therefore, as UT-CON and UT-SCT were matched for MAP and relative MAP; this difference should be of no consequence to the inflammatory and vascular adhesion findings.

TABLE 3. Plasma concentrations of the soluble adhesion molecules sICAM-1, sE-selectin, and sP-selectin in UT and T CON and SCT subjects at rest, at the end of the incremental exercise, and after 1, 2, and 24 h of recovery.

		$T_{rest}$	$T_{ex}$	$T_{1h}$	$T_{2h}$	$T_{24h}$
sICAM-1 (ng·mL <sup>-1</sup> )	UT-CON	547.5 ± 95.2	594.5 ± 98.6*	545.6 ± 96.5†	526.2 ± 90.6†	516.4 ± 94.6†
	UT-SCT	565.4 ± 108.5	609.6 ± 126.3*	565.8 ± 125†	575.1 ± 118.2†	579.3 ± 125.2†
	T-CON	389.2 ± 40.9	424.4 ± 54.8*	366.4 ± 43.5†	370.4 ± 37.5†	433.9 ± 63.5†
	T-SCT	483.39 ± 90.64	528.5 ± 98.66*	476.27 ± 93.88†	503.8 ± 98.49†	489.08 ± 97.01†
sE-selectin (ng·mL <sup>-1</sup> )	UT-CON	52.9 ± 8.1	59.2 ± 8.5	53.5 ± 5.9†	50 ± 6.4†	47.4 ± 5.9†
	UT-SCT	52.9 ± 9.8	59.5 ± 12.3	57.7 ± 9.7†	51.9 ± 8.3†	50.3 ± 10.1†
	T-CON	59.9 ± 12.9	67.3 ± 15.5	58.4 ± 15.7†	58.3 ± 14.6†	62 ± 18†
	T-SCT	52.2 ± 8.8	60.7 ± 9.7	48.7 ± 8.7†	47 ± 8.5†	46.2 ± 7.4†
sP-selectin (ng·mL <sup>-1</sup> )	UT-CON	70.4 ± 10.1	291.9 ± 112.9‡	59.1 ± 8.8	68.4 ± 10.4	49.1 ± 7.4†
	UT-SCT	90.9 ± 18.6	121.3 ± 20.3‡	98.2 ± 22.6	116.6 ± 18.2	75.6 ± 21.5
	T-CON	119.8 ± 19.1	175.8 ± 19.7	236.7 ± 76.9	157.9 ± 22	124 ± 17.3§
	T-SCT	119.2 ± 37	105.8 ± 11.8	117 ± 24.9	128.3 ± 36	87.5 ± 23.4§

Values are presented as means ± SE.

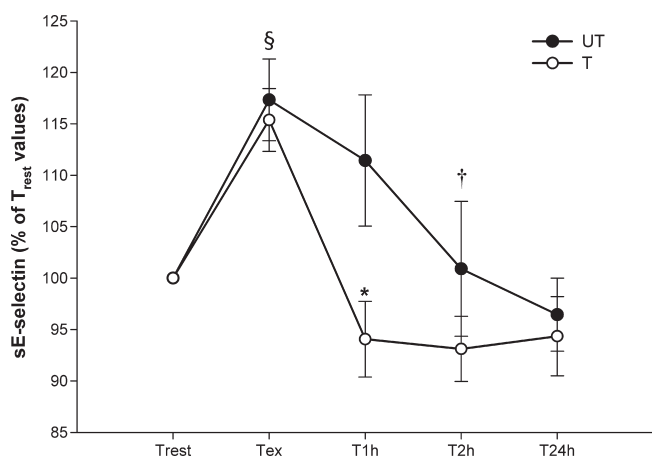
\* Significant differences compared with  $T_{rest}$  in all groups; † significant differences compared with  $T_{ex}$  in all groups; ‡ significant differences compared with  $T_{rest}$  for the UT groups only; § significant difference compared with  $T_{2h}$  for the T groups ( $P < 0.05$ ).



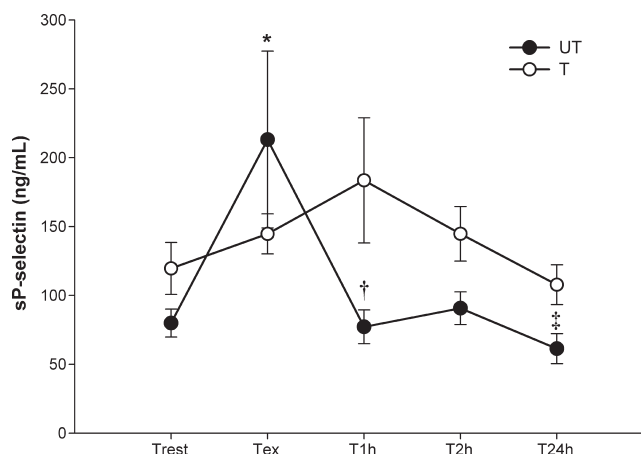
**FIGURE 1**—Effect of a maximal and incremental exercise on plasma concentrations of sVCAM-1 in untrained (UT, SCT and CON) or in trained (T, SCT and CON) groups at rest ( $T_{rest}$ ), at the end of the exercise ( $T_{ex}$ ), and during the recovery ( $T_{1h}$ ,  $T_{2h}$ , and  $T_{24h}$ ). Values are presented as means  $\pm$  SE. \*Significant difference between the UT-SCT and the three other groups ( $P < 0.05$ ); §significant difference compared with  $T_{rest}$  for all the groups.

No differences were found at rest between the four groups for hematological parameters, except for the mean corpuscular volume, which was significantly lower in the SCT carriers. This can be explained by the coexistence in half of SCT subjects (SCT- $\alpha$ T subjects) of  $\alpha$ -thalassemia mutation (Table 1), which is known to diminish the RBC volume (38). Also and in accordance with Singh et al. (37), the T subjects exhibited a higher level of circulating platelets than the UT.

**Effect of habitual physical activity on circulating inflammatory and adhesive molecules at rest.** The baseline levels of all the studied molecules were similar between the four groups except for sVCAM-1. Whereas



**FIGURE 2**—Effect of a maximal and incremental exercise on plasma concentrations of sE-selectin in untrained (UT, SCT and CON) or in trained (T, SCT and CON) groups at rest ( $T_{rest}$ ), at the end of the exercise ( $T_{ex}$ ), and during the recovery ( $T_{1h}$ ,  $T_{2h}$ , and  $T_{24h}$ ). Values are presented as means  $\pm$  SE. Values are expressed as the percentage of the resting values. §Significant difference compared with  $T_{rest}$  for all the groups ( $P < 0.05$ ); \*significant difference compared with  $T_{ex}$  for the T groups; †significant difference compared with  $T_{ex}$  and  $T_{1h}$  for the UT groups ( $P < 0.05$ ).



**FIGURE 3**—Effect of a maximal and incremental exercise on the plasma concentrations of sP-selectin in untrained (UT, SCT and CON) or in trained (T, SCT and CON) groups at rest ( $T_{rest}$ ), at the end of the exercise ( $T_{ex}$ ), and during the recovery ( $T_{1h}$ ,  $T_{2h}$ , and  $T_{24h}$ ). Values are presented as means  $\pm$  SE. \*Significant difference compared with  $T_{rest}$  for the UT groups; †significant difference compared with  $T_{ex}$  for the UT groups; ‡significant difference compared with  $T_{2h}$  for the T groups ( $P < 0.05$ ).

sVCAM-1 concentrations were significantly more elevated in UT-SCT subjects than that in their CON counterparts ( $P < 0.05$ ), those concentrations were similar between the two trained groups (T-SCT and T-CON). The present results are in accordance with those reported by Tripette et al. (40), who did not observe significant sVCAM-1 difference in trained SCT subjects compared with subjects with normal hemoglobin (HbAA). Conversely Monchanin et al. (27,28) observed significant higher sVCAM-1 concentrations in a trained SCT population compared with a healthy trained population at rest. Our results are difficult to compare with those of Monchanin et al. (27,28) and Tripette et al. (40) because i) our subjects were not experienced in cycle ergometer (that explains the poor measured MAP) and ii) several SCT carriers presented the double mutation  $\alpha$ -thalassemia/SCT (63.6% for the T-SCT and 42.8% for the UT-SCT), which might be considered as beneficial for this population (26–28). Because plasma sVCAM-1 is reduced in SCT- $\alpha$ T subjects compared with SCT-only subjects (27,28), this might explain the variability of sVCAM-1 concentrations in our cohort and the discrepancies between our findings and those of Monchanin et al. (27,28) (Fig. 1).

Nevertheless, this study is the first to show a differential effect of habitual physical activity on sVCAM-1 concentrations in SCT carriers. Higher sVCAM-1 concentrations were observed in the UT-SCT compared with the T-SCT subjects (Fig. 1). The present results extend those of Adamopoulos et al. (2), who found, in healthy subjects and in patients with chronic heart failure, that baseline sVCAM-1 plasma concentrations were reduced after an exercise training program (30 min of cycling at 70%–80%  $\dot{V}O_{2max}$  per day, 5 d $\cdot$ wk<sup>-1</sup> during 12 wk). Furthermore, Shiu et al. (34) showed that soluble adhesion molecules at

rest reflect the degree of endothelium vascular activation; thus, the present results suggest that the vascular endothelium is less activated in the T group compared with the UT group. Because VCAM-1 is involved with very late antigen-4 (VLA-4) in the interactions between leukocytes (17) and reticulocytes/endothelial cells (37,34), increased endothelial expression of VCAM-1 should lead in SCT carriers to an increased risk of blood cell aggregation and thrombus formation, that is, vaso-occlusive events (15,31). We propose that the risk for such vaso-occlusive events might be more pronounced among the SCT subjects who do not engage in regular physical activity. Because high sVCAM-1 has been associated with pulmonary hypertension, organ failure, and mortality in SCD (19), further investigations will be required to determine the potential effects of physical activity in homozygous HbS carriers.

It is now well established that physical exercise disturbs homeostasis and that one of the main results of physical training is to attenuate these perturbations. Thus, among SCT carriers, known factors that promote sickling, such as increased pH, could be less influential and contribute to limiting the polymerization process after training compared with before training. Consequently, endothelial activation and sVCAM-1 expression (33,34) as suggested in the present study would be accordingly attenuated. A putative alternative explanation would be that because training is known to restrict the inflammatory response induced by an acute exercise bout (by limiting pro-inflammatory responses and increasing the anti-inflammatory cytokine release) (32), exercise training might limit vascular activation by its anti-inflammatory pathway (32,39). This has been suggested by Tripette et al. (40), who showed increased postexercise IL-6 concentrations in trained SCT subjects. This cytokine has been demonstrated to exert anti-inflammatory effects through an inhibition of the production of TNF $\alpha$  and IL-1 and a stimulation of the production of IL-1ra and IL-10 (32). Further studies will have to confirm the possibility that an elevated physical activity may limit the adhesive potential in HbS carriers.

**Effects of training on incremental exercise and recovery of circulating inflammatory and adhesion molecules.** A significant increase in sVCAM-1, sE-selectin, sICAM-1, and sCD40L plasma concentrations was observed in the four groups in response to incremental exercise (Tables 2 and 3). Although these findings are in accordance with several previous studies in healthy subjects or in patients with peripheral arterial disease or SCT carriers (5,27,28,35,36), they contrast with other findings obtained in healthy subjects or in SCT carriers (27,40,42). The use of the endothelial circulating molecules to observe the effects of an acute exercise on the endothelial activation is because at rest, soluble molecules reflect the level of underlying endothelial activation (34). A postexercise increase in plasma adhesion molecules is thought to result from the shedding of these molecules from the cell surface, possibly as a result of inflammation or increase in shear

stress induced by exercise (24). As shown in Figures 1 and 2, plasma sVCAM-1 and sE-selectin concentrations were raised in response to incremental exercise. These molecules are known to reflect endothelial dysfunction and mediate the interaction between leukocytes and platelets/endothelium (5) and between leukocytes and reticulocytes/endothelium (34), respectively. Similarly, the marked increase in sCD40L could reflect increased CD40L expression, primarily on lymphocytes' surface (8) but also on platelets, endothelial cells, smooth muscle cells, macrophages, dendritic cells, fibroblasts, and mast cells (42). The rise of sCD40L has been associated to the pathogenic processes of chronic inflammatory disease (42) and to the presence of increased prothrombotic activity (22). The present findings thus suggest that incremental exercise might be responsible for endothelial activation in HbAA as in HbAS subjects, independent of their habitual physical activity levels. Of note, the rise of the soluble form of ICAM-1 is difficult to interpret because ICAM-1 is expressed in many types of cells, including endothelial cells, fibroblasts, epithelial cells, and multiple cells of hematopoietic lineage (36), such that it is impossible to ascertain whether the present increase of sICAM-1 indeed results from an increase in endothelial ICAM-1. The latter possibility is unlikely because no significant increases in sICAM-1 have been reported after maximal exercise in SCT subjects (27) or in HbAA subjects (4). The sICAM-1 increase reported by Akimoto et al. (4) after endurance or downhill exercise may be attributed to muscular damage and inflammation induced by these types of exercise.

Although widely used, assessment of soluble molecules to indirectly evaluate the endothelium expression immediately after an acute exercise is controversial. Tripette et al. (40) recently argued that the postexercise increase in adhesion molecules observed in several studies may be accounted for by an exercise-induced hemoconcentration. Although water loss during a 15-min incremental exercise should be rather minor in our population (30), the "hemoconcentration hypothesis" should not be dismissed altogether. Thus, the postexercise changes described heretofore should be viewed as the result of both exercise-induced physiological responses (endothelial activation) and hemoconcentration.

No significant changes in plasma interleukins (TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-8, and IL-10) were observed in response to exercise. These results were unexpected because IL-4, IL-8, and TNF- $\alpha$  are pro-inflammatory cytokines that are responsible for endothelial activation and adhesion molecule expression (23,34). It is thus possible that alternative pathways such as oxidative stress (18) may be recruited.

**Differential effects of habitual physical activity on exercise-induced variations of soluble P- and E-selectin.** The different temporal trajectories among T and UT groups in sE-selectin and sP-selectin after an acute exercise are of remarkable interest. First, in accordance with some authors (10,35), a significant rise in sP-selectin was observed at the end of the incremental exercise in the UT subjects only (+167%). However, despite the present

statistically significant finding concerning the sP-selectin increase, when we observe the individual results, two UT populations are distinguished. Six of the 16 UT subjects exhibit more than 50% postexercise increase (high responders). The 10 other subjects are characterized by 13%–50% postexercise sP-selectin increase (low responders). As sP-selectin is an important marker of platelet activation (42,43), our results suggest that platelet activation in response to an acute exercise is characterized by an important interindividual variability and is more pronounced in subjects with low physical activity than that in their trained counterparts. This is in agreement with the observation of Kestin et al. (21), who showed in a healthy population that strenuous exercise resulted in both platelet activation and platelet hyperactivity in sedentary subjects but not in physically active subjects. These authors further strengthened the link between platelet activation/aggregation and ischemia and emphasized the fact that sedentary subjects are more vulnerable to death during exercise (21). Chronic exercise is also known to increase fibrinolysis and to reduce platelets aggregation and activation (24), all of which may contribute to limit the thrombus formation in response to an acute exercise in T-SCT subjects. However, our hypothesis contrasts with those of Connes et al. (14), who did not find differences in the coagulation markers (prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and antithrombin III activity) between SCT carriers and sedentary subjects in response to a maximal exercise. These authors hypothesized that the clinical complications observed in some SCT carriers during exercise are not the consequence of increased blood coagulation activity (14). In addition, no difference between T and UT was observed concerning sCD40L plasma concentrations, which are considered as prothrombotic activity marker (22). To resolve these discrepancies, the effects of habitual physical activity on platelet metabolism need to be further examined, particularly in SCT carriers.

A significant increase in sE-selectin was also observed in response to graded exercise in all groups. However, when sE-selectin is expressed relative to its resting values, slower recovery kinetics was observed in the UT group (2 h) as compared with the T subjects (1 h). This finding is in accordance with Boos et al. (6), who found that sE-selectin increased immediately after exercise in subjects with cardiovascular disease, without any decrease 30 min later (6). We hypothesize that the differences in the recovery process between the T and the UT groups might be accounted for either by better clearance of sE-selectin in the T subjects or by faster recovery of the basal plasma volume in the

T group (i.e., auto-hemodilution or better hydration post-exercise for the trained subject—not measured). The latter might be particularly relevant for SCT carriers because a higher hemodilution should restrict the occurrence of two factors involved in vaso-occlusive events, namely, blood viscosity (which increases shear stress and consequently the vascular adhesion activation) (27) and RBC dehydration, which would lead to an impaired RBC deformability (12).

Taken together, our results might appear contradictory compared with those of the literature presenting case reports of accidents in SCT carriers after exercise (16,25). In these earlier studies, vaso-occlusive crises sometimes leading to sudden death were reported in young athletes and military recruits, and both of these populations can be viewed as “trained.” These studies suggested that these populations appear to be “at high risk” for vaso-occlusive events. However, our subjects performed an acute exercise paradigm in standardized conditions of temperature, duration, and hydration. This contrasts with the multiple “extreme” and adverse environmental conditions (e.g., altitude, temperature, dehydration, exhausting long-lasting exercises) that were present and described in the case-report studies. These differences in environmental conditions might explain the aforementioned apparent contradiction. Nevertheless, such explanations should not minimize our awareness and need for precautions, considering the many unanswered questions around SCT and exercise that need to be resolved in the future.

In conclusion, a physically active lifestyle is associated with low baseline and postexercise levels of sVCAM-1 in the SCT carrier group, with a limited plasma sP-selectin increase in response to an incremental exercise and with a rapid recovery in plasma sE-selectin. Thus, increased levels of chronic physical activity may confer beneficial effects on endothelial activation and possibly reduce the likelihood of vascular occlusions in SCT carriers. As endothelial activation and sVCAM-1 concentrations are associated with pulmonary hypertension, organ failure, and mortality in SCD (19), these results should be of interest and support further investigations in SCD patients.

This study was supported by grants from l’Ambassade de France au Cameroon in Yaoundé.

The authors thank Mrs. Gaëlle Lepape, Pr. Christophe Nouedoui, and Mrs. Philippe Stofft and François-Xavier Owona<sup>†</sup> for their helpful assistance and the general direction of the Central Hospital of Yaoundé for its hospitality.

The authors also thank the financial and logistic support of the Cameroonian Ministries of Public Health and of Higher Education.

The results of the present study do not constitute endorsement by the American College of Sports Medicine.

## REFERENCES

- Adamopoulos S, Parissis J, Karatzas D, et al. Physical training modulates proinflammatory cytokines and the soluble Fas/soluble Fas ligand system in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(4):653–63.
- Adamopoulos S, Parissis J, Kroupis C, et al. Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2001;22(9):791–7.
- Ajayi AAL. Should the sickle cell trait be reclassified as a disease state? *Eur J Int Med*. 2005;16(6):463.
- Akimoto T, Furudate M, Saitoh M, et al. Increased plasma concentrations of intercellular adhesion molecule-1 after strenuous exercise associated with muscle damage. *Eur J Appl Physiol*. 2002; 86(3):185–90.
- Bartzeliotou AI, Margeli AP, Tsironi M, et al. Circulating levels



- of adhesion molecules and markers of endothelial activation in acute inflammation induced by prolonged brisk exercise. *Clin Biochem.* 2007;40(11):765–70.
6. Boos CJ, Balakrishnan B, Lip GYH. The effects of exercise stress testing on soluble E-selectin, von Willebrand factor, and circulating endothelial cells as indices of endothelial damage/dysfunction. *Ann Med.* 2008;40(1):66–73.
  7. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. *Blood.* 2000;95(1):360–2.
  8. Chung I, Goyal D, Macfadyen RJ, Lip GYH. The effects of maximal treadmill graded exercise testing on haemorheological, haemodynamic and flow cytometry platelet markers in patients with systolic or diastolic heart failure. *Eur J Clin Invest.* 2008;38(3):150–8.
  9. Clarkson P, Montgomery HE, Mullen MJ, et al. Exercise training enhances endothelial function in young men. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33(5):1379–85.
  10. Collins P, Ford I, Ball D, Macaulay E, Greaves M, Brittenden J. A preliminary study on the effects of exercising to maximum walking distance on platelet and endothelial function in patients with intermittent claudication. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006;31(3):266–73.
  11. Connes P, Hardy-Dessources M-D, Hue O. Counterpoint: sickle cell trait should not be considered asymptomatic and as a benign condition during physical activity. *J Appl Physiol.* 2007;103(6):2138–40.
  12. Connes P, Hue O, Tripette J, Hardy-Dessources MD. Blood rheology abnormalities and vascular cell adhesion mechanisms in sickle cell trait carriers during exercise. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008;39(1–4):179–84.
  13. Connes P, Monchanin G, Perrey S, et al. Oxygen uptake kinetics during heavy submaximal exercise: effect of sickle cell trait with or without alpha-thalassemia. *Int J Sports Med.* 2006;27(7):517–25.
  14. Connes P, Tripette J, Chalabi T, et al. Effects of strenuous exercise on blood coagulation activity in sickle cell trait carriers. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008;38(1):13–21.
  15. Frenette P, Atweh G. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest.* 2007;117(4):850–8.
  16. Harrelson G, Fincher A, Robinson J. Acute exertional rhabdomyolysis and its relationship to sickle cell trait. *J Athl Train.* 1995;30(4):309–12.
  17. Hemler M. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol.* 1990;8:365–400.
  18. Ji L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999;222(3):283–392.
  19. Kato G, Martyr S, Blackwelder W, et al. Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *Br J Haematol.* 2005;130(6):943–53.
  20. Kaul D, Nagel R. Sickle cell vasoocclusion: many issues and some answers. *Experientia.* 1993;49(1):5–15.
  21. Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR, Errichetti A, Rosner BA, Michelson AD. Effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity. *Circulation.* 1993;88(4 pt 1):1502–11.
  22. Lee SP, Ataga KI, Orringer EP, Phillips DR, Parise LV. Biologically active CD40 ligand is elevated in sickle cell anemia: potential role for platelet-mediated inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(7):1626–31.
  23. Makis AC, Hatzimichael EC. The role of cytokines in sickle cell disease. *Ann Hematol.* 2000;79(8):407–13.
  24. Marsh SA, Coombes JS. Exercise and the endothelial cell. *Int J Cardiol.* 2005;99(2):165–9.
  25. Mitchell BL. Sickle cell trait and sudden death—bringing it home. *J Natl Med Assoc.* 2007;99(3):300–5.
  26. Monchanin G, Connes P, Wouassi D, et al. Hemorheology, sickle cell trait, and alpha-thalassemia in athletes: effects of exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2005;37(7):1086–92.
  27. Monchanin G, Serpero LD, Connes P, et al. Effects of progressive and maximal exercise on plasma levels of adhesion molecules in athletes with sickle cell trait with or without alpha-thalassemia. *J Appl Physiol.* 2007;102(1):169–73.
  28. Monchanin G, Serpero LD, Connes P, et al. Plasma levels of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in athletes with sickle cell trait with or without  $\alpha$ -thalassemia during endurance exercise and recovery. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008;40(2):89–97.
  29. Noguchi CT, Torchia DA, Schechter AN. Polymerization of hemoglobin in sickle trait erythrocytes and lysates. *J Biol Chem.* 1981;256(9):4168–71.
  30. O'Toole ML, Paolone AM, Ramsey RE, Irion G. The effects of heat acclimation on plasma volume and plasma protein of females. *Int J Sports Med.* 1983;4(1):40–4.
  31. Okpala I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. *Curr Opin Hematol.* 2006;13(1):40–4.
  32. Petersen A, Pedersen B. The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57(10 suppl):43–51.
  33. Sakhalkar VS, Rao SP, Weedon J, Miller ST. Elevated plasma sVCAM-1 levels in children with sickle cell disease: impact of chronic transfusion therapy. *Am J Hematol.* 2004;76(1):57–60.
  34. Shiu Y, Udden M, McIntire L. Perfusion with sickle erythrocytes up-regulates ICAM-1 and VCAM-1 gene expression in cultured human endothelial cells. *Blood.* 2000;95(10):3232–41.
  35. Signorelli SS, Mazzarino MC, Di Pino L, et al. High circulating levels of cytokines (IL-6 and TNF $\alpha$ ), adhesion molecules (VCAM-1 and ICAM-1) and selectins in patients with peripheral arterial disease at rest and after a treadmill test. *Vasc Med.* 2003;8(1):15–9.
  36. Silvestro A, Schiano V, Bucur R, Brevetti G, Scopacasa F, Chiariello M. Effect of propionylcarnitine on changes in endothelial function and plasma levels of adhesion molecules induced by acute exercise in patients with intermittent claudication. *Angiology.* 2006;57(2):145–54.
  37. Singh I, Quinn H, Mok M, et al. The effect of exercise and training status on platelet activation: do cocoa polyphenols play a role? *Platelets.* 2006;17(6):361–7.
  38. Steinberg MH, Embury SH. Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. *Blood.* 1986;68(5):985–90.
  39. Suzuki K, Peake J, Nosaka K, et al. Changes in markers of muscle damage, inflammation and HSP70 after an Ironman Triathlon race. *Eur J Appl Physiol.* 2006;98(6):525–34.
  40. Tripette J, Connes P, Hedreville M, et al. Patterns of exercise-related inflammatory response in sickle cell trait carriers. *Br J Sports Med.* 2010;44(4):232–7.
  41. Westerman MP, Green D, Gilman-Sachs A, et al. Coagulation changes in individuals with sickle cell trait. *Am J Hematol.* 2002;69(2):89–94.
  42. Zietkowski Z, Skiepkowski R, Tomasiak MM, Bodzenta-Lukaszyk A. Soluble CD40 ligand and soluble P-selectin in allergic asthma patients during exercise-induced bronchoconstriction. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 2008;18(4):272–8.
  43. Zoppini G, Targher G, Zamboni C, et al. Effects of moderate-intensity exercise training on plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in older patients with type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006;16(8):543–9.

---

**Etude n°2 : Effets *in vivo* de l'effet de la roue d'activité chez la souris sur l'anatomie et la fonction cardiaque : étude en imagerie par résonance magnétique nucléaire.**

---

E. Aufradet, A. Bessaad, H. Alsaid, F. Schäfer, M. Sigovan, G. De Souza, E. Chirico, C. Martin et E. Canet-Soulas.

Publié dans *Experimental Biology and Medicine* en 2012.

Volume 237; pages 263-270.

---

Cet article a un double but : le premier est de valider un protocole d'entraînement en roue d'activité chez la souris afin qu'il soit utilisé chez la souris SAD. Le deuxième est de valider une méthode de caractérisation de l'hypertrophie cardiaque *in vivo* chez le petit animal par IRM. La fréquence respiratoire élevée des souris, couplée à leur petite taille, rend l'observation par IRM de l'anatomie cardiaque assez difficile à mettre en œuvre. Cette étude se proposait ainsi de tester l'utilisation d'un système de synchronisation cardio-respiratoire en parallèle à l'acquisition non invasive des images cardiaques par IRM. Les images n'étant acquises que lors de la phase expiratoire du cycle respiratoire, cela permet de s'astreindre des mouvements de la cage thoracique. Afin de valider la méthode, les mesures cardiaque effectuées *in vivo* ont été comparées à des analyses *ex vivo* comprenant la pesée du cœur et des muscles que sont le soléaire et le tibialis antérieur (TA) ainsi que le dosage d'activités enzymatiques (cytochrome c oxydase – COX –, citrate synthase – CS –, et succinate deshydrogénase – SDH). La comparaison a été effectuée chez des souris saines C57Bl/6 soumises ou non à 12 semaines d'activité physique volontaire en roue d'activité. En réponse à cette session d'activité physique régulière, les données *ex vivo* montrent une augmentation de la masse du cœur, du ventricule gauche, du soléaire et du TA ainsi que de l'activité de la COX dans le soléaire. En parallèle, les analyses *in vivo* par IRM montrent un accroissement de la masse du ventricule gauche associé à une augmentation des volumes télédiastolique, télésystolique et du volume d'éjection systolique. Toutes ces augmentations suggèrent une hypertrophie cardiaque associée à l'entraînement physique, comme cela a déjà été démontré chez l'homme (640) ou l'animal (641). De plus, la masse cardiaque pesée *ex vivo* et celle obtenue *in vivo* par imagerie sont significativement corrélées. Cette étude valide donc d'une part le protocole d'imagerie, mais aussi le protocole d'activité physique. Le

relevé hebdomadaire de la distance parcourue par les souris, présenté dans l'article, montre qu'au fur et à mesure des semaines, cette distance décroît et ce essentiellement dans les dernières semaines. Cela nous a donc amené à raccourcir le protocole d'activité physique volontaire à 8 semaines au lieu de 12 afin de maintenir un niveau de course relativement stable tout au long du protocole.

## ***In vivo* cardiac anatomical and functional effects of wheel running in mice by magnetic resonance imaging**

**Emeline Aufradet<sup>1</sup>, Amine Bessaad<sup>1,2</sup>, Hasan Alsaïd<sup>2</sup>, Florian Schäfer<sup>1</sup>, Monica Sigovan<sup>2</sup>, Geneviève De Souza<sup>1</sup>, Erica Chirico<sup>1,2</sup>, Cyril Martin<sup>1</sup> and Emmanuelle Canet-Soulas<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Center of Research and Innovation on Sports (CRIS EA647); <sup>2</sup>CREATIS-LRMN, UMR CNRS 5220, U630 INSERM, University of Lyon 1, University of Lyon, 69622 Villeurbanne Cedex, France

Corresponding author: Cyril Martin, Center of Research and Innovation on Sports, University of Lyon, University Claude Bernard Lyon 1, Campus La Doua, Bâtiment Raphaël Dubois, 27–29 Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France. Email: cyril.martin@univ-lyon1.fr

### **Abstract**

Physical activity is frequently used as a strategy to decrease pathogenesis and improve outcomes in chronic pathologies such as metabolic or cardiac diseases. In mice, it has been shown that voluntary wheel running (VWR) could induce an aerobic training effect and may provide a means of exploring the relationship between physical activity and the progression of pathology, or the effect of a drug on locomotor activity. To the best of our knowledge, *in vivo* magnetic resonance imaging (MRI) and other non-invasive methods had not been investigated for training evaluation in mice; therefore, it was proposed to test an MRI method coupled with a cardiorespiratory gating system on C57Bl/6 mice for *in vivo* heart anatomical and functional characterization in both trained and untrained animals. Twenty mice were either assigned to a 12-week VWR program or to a control group (CON – no wheel in the cage). At week 12, MRI scans showed an increase in the left ventricular (LV) wall mass in the VWR group compared with the CON group. The *ex vivo* measurements also found an increase in the heart and LV weight, as well as an increase in oxidative enzyme activities (i.e. cytochrome c oxidase [COx] in the soleus). In addition, correlations have been observed between *ex vivo* LV/body weight ratio, COx activity in the soleus and *in vivo* MRI LV wall mass/body weight. In conclusion, mouse cardiac MRI methods coupled with a cardiorespiratory gating system are sufficiently effective and feasible for non-invasive, training-induced heart hypertrophy characterization, and may be used for longitudinal training level follow-up in mouse models of cardiovascular and metabolic diseases.

**Keywords:** enzymology, MRI heart function, mouse, physical training, imaging markers, left ventricular hypertrophy

*Experimental Biology and Medicine* 2012; **237**: 263–270. DOI: 10.1258/ebm.2011.011034

### **Introduction**

Magnetic resonance imaging (MRI) is an increasingly used imaging modality in animal experiments as it offers a non-invasive option for observation of tissues and cells. For example, MRI has been used for *in vivo* organ characterization (heart, spleen, brain)<sup>1</sup> as well as for cellular observation using macrophage or adhesion molecule nanoparticle targeting strategies.<sup>2</sup> The key benefits of non-invasive MRI protocols include (1) a reduction in the number of animals used and sacrificed due to the possibility of longitudinal follow-up; (2) the option of using the same animal as a control; and (3) a reproducible and sufficiently sensitive method for the simultaneous assessment of multiple markers.<sup>2,3</sup>

The purpose of this study was to perform an *in vivo* MRI heart characterization in mice in order to evaluate their

physical training level, which is known to be associated with an increase in cardiac mass. Indeed, the prevalence of chronic pathologies such as diabetes, metabolic disease, heart failure, and cardiovascular disease or neuronal degeneration has led to the addition of regular physical training as an important strategy for the prevention or the treatment of these diseases. Physical activity is known to elicit physical and metabolic adaptations in cardiac<sup>4</sup> and skeletal muscle,<sup>5</sup> and may therefore decrease the pathogenesis of these diseases.<sup>6–13</sup>

Moreover, exercise activities are used in clinical trials as a readout parameter to explore the benefits of novel pharmacological or molecular agents for the treatment of heart failure or diabetes.<sup>14,15</sup> Therefore, the preclinical development of such agents will benefit significantly from the



development of a non-invasive MRI preclinical protocol to evaluate therapies *in vivo* in a serial manner.

Murine models are frequently used to study pathophysiology or the effects of therapeutic strategies in heart failure,<sup>16,17</sup> metabolic and genetic diseases,<sup>18</sup> and voluntary wheel running (VWR) is among the most commonly used exercise training procedure in these animals. Its effects are characterized by cardiac hypertrophy<sup>19</sup> and an increase in some oxidative (COx - cytochrome *c* oxidase)<sup>20-22</sup> or Krebs cycle (CS - citrate synthase; SDH - succinate dehydrogenase)<sup>4,20-25</sup> enzyme activities. In this context, it may be interesting to develop a non-invasive, robust and reproducible marker of the training level in mice.

To evaluate the training level in these animals, the authors rely on activity data (such as mean daily or weekly running distance and/or time) or *ex vivo* measurements (such as muscle enzyme activities or heart weight). To our knowledge, no *in vivo* procedure has ever been described to determine the physiological impact of a training program in mice. MRI offers the possibility of examining the heart *in vivo*, but it is associated with technical difficulties in small animals because of the high frequency of respiratory movements. In the present study, we propose to validate an *in vivo* method in order to evaluate the training level in mice by measuring the anatomical and functional left ventricular (LV) parameters. For this purpose, we used a non-invasive MRI method coupled with a cardiorespiratory gating system in order to acquire images during the expiration phase of the respiratory cycle and prevent artifacts due to respiratory perturbation.

## Methods

### Animals

To avoid a gender effect, 12-week-old male C57BL/6 mice ( $n = 20$ ) (Charles River, L'Arbresle, France) were randomly assigned to a control group (CON;  $n = 10$ ) or VWR group ( $n = 10$ ). After reception and one week of acclimation, mice were assigned to housing at two per cage with or without running wheels. After a two-week wheel adaptation period, mice were assigned to an individual cage. All animals were maintained on a 12 h light-dark cycle and were supplied with food and water *ad libitum*. One week before the dissection, a cardiac MRI was performed on six mice per group. Body weight, food and water consumption were recorded weekly. The ACSM animal care standards for experimental procedures were followed and all animal protocols were approved by the regional animal care committee (Rhones-Alpes, France).

### Voluntary wheel-running protocol

All animal houses were equipped with a mouse 12.5-cm metal wheel (Hagen-61700; Montreal, QC, Canada). The number of completed revolutions was monitored by a magnetic switch affixed to each wheel and data were captured using a digital magnetic counter (model BC906; Sigma Sport, Neustadt, Germany). During the 12-week experimental period, the total running distance, total running time and

average speed were recorded before the counter was reset each week.

### *In vivo* cardiac MRI

Imaging was performed on a 4.7 Tesla Oxford magnet interfaced to a Bruker console (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Germany) equipped with a 10-cm diameter actively shielded gradient set (250 mT/m). A homemade Alderman and Grant volume coil (30 mm length and 26 mm inner diameter) was used to obtain optimal RF homogeneity over the volume of interest.

Eleven weeks after the beginning of the running protocol, cardiac MRI was performed on 12 mice randomly selected (6 VWR and 6 CON) using a homemade double cardiorespiratory gating system following the procedure of Alsaïd *et al.*<sup>26</sup> Mice were anesthetized with continuously inhaled isoflurane at 1.5–2% in ambient air for maintaining a stable respiratory rate. The body temperature was maintained in the magnet using a circulating water heating blanket (37°C). Following a tripilot gradient-echo image, a 2D-FLASH sequence was used to acquire two long-axis slices (in the coronal and sagittal planes) using the following parameters: TR/TE = 124/4 ms, matrix = 256 × 256, field of view (FOV) = 35 × 35 mm, slice thickness = 1 mm and number of average (NAV) = 2. Perpendicular to the long axis, a 2D-FLASH sequence was used to acquire short-axis cine images (5–6 contiguous slices covering the entire left ventricle): TR/TE = 10/3 ms, flip angle = 20°, matrix = 128 × 128, FOV = 20 × 20 mm, slice thickness = 1 mm, NAV = 8 and 15–17 frames (images) were constructed to cover each phase of the entire cardiac cycle (R-R) of the animal.

### MR image analysis

All images were analyzed using Image J Software (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). LV function was evaluated using short-axis images in end diastole and end systole. The endocardial (LV inner border) and epicardial borders (LV outer border) were manually traced and end-diastolic volume (EDV), end-systolic volume (ESV), stroke volume (SV), ejection fraction (EF) and LV myocardial mass (LV wall mass) were computed from the traced borders. To calculate the LV myocardial mass, the end-diastolic myocardial volume (EDV outer border minus EDV inner border) was multiplied by the specific density of the myocardium (1.05 g/cm<sup>3</sup>). The LV remodeling index (LV myocardial mass/EDV) was calculated in order to determine the pattern of ventricular remodeling in the two groups. An increased remodeling index is consistent with concentric hypertrophy, whereas a reduced remodeling index is indicative of isolated cavity dilation.<sup>27</sup>

### Muscle isolation and heart weight

After waiting one week for the imaged mice to completely recover from anesthesia, all the mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (50 mg/kg; Doletal<sup>®</sup>, Vétoquinol, Lure, France) and transcardially

perfused for 70 s with 9‰ NaCl (Sigma, St Louis, USA). The heart was removed, rinsed in saline, dried with a paper towel and weighed, and the left ventricle was dissected and weighed separately.

Soleus and tibialis anterior (TA) muscles were dissected, weighed and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

**Mitochondrial enzymatic activities**

Lower limb muscles are among the most relevant to evaluate the physical training response on mitochondrial enzymatic activities.<sup>20,28,29</sup> Thus, one TA or two soleus muscles were cut into thin pieces and homogenized on ice at 10% with a buffer (225 mmol/L mannitol; 75 mmol/L sucrose; 10 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L EDTA, pH 7.2). Homogenates were then centrifuged for 20 min at 2500g (4°C). Supernatants were frozen at -80°C. Protein concentrations were determined spectrophotometrically (Biophotometre, Eppendorf, Germany) using a BCA kit (Sigma).

**COx activity**

The complex IV activity was measured in the soleus and TA, as previously described,<sup>30</sup> by spectrophotometric observation (at 550 nm) of the cytochrome c (C-7752; Sigma) oxidation kinetics.

**CS activity**

CS activity was measured in the soleus and TA by the method of Shepherd and Garland.<sup>31</sup> Briefly, the citrate synthesis rate from acetyl coenzyme A and oxaloacetate was determined according to a coupling reaction between coenzyme A and DTNB (5,5'-dithiobis [2-nitrobenzoic acid]). This coupling reaction was spectrophotometrically measured at 412 nm during 45 s.

**SDH activity**

SDH activity was measured in the soleus and TA by DCIP reduction kinetics (2,6-dichloroindophenol; D1878; Sigma) at 600 nm as previously described.<sup>30</sup>

All the enzymatic activities were measured with a spectrophotometer (InfiniteM200; Tecan, Männedorf, Switzerland) at 37°C and expressed in nanomoles of product formed per minute and per milligram of protein. All products were purchased from Sigma.

**Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using STATISTICA (Tulsa, OK, USA) on six mice per group for the MRI parameters and on 10 mice per group for the *ex vivo* parameters. The data are expressed as mean ± SE. To determine the significance of parameter changes, the Mann-Whitney U test was performed between the CON and VWR groups. Spearman correlation coefficients were used to describe the linear association between variables. Probability (P) values of <0.05 were considered statistically significant.

**Results**

**Animal characteristics and running wheel activity**

Quantitative results for the food and water consumptions and the exercise activities are summarized in Table 1. Weekly consumption of food and water was significantly higher (+22.9% and +18.7%, respectively) in the VWR group compared with the CON group. However, as all weights were similar in both groups at the beginning of the study (CON: 23.47 ± 0.67 g and VWR: 23.93 ± 0.41 g), this increase was not associated with any changes in body weight in either group. Mice housed in a cage equipped with a running wheel ran an average distance of 37.46 ± 2.35 km per week over 35 h 19 min ± 6 h 22 min.

The exercise phenotype, including the average distance run over the 12 weeks in the VWR group, is shown in Figure 1. Mice reached a maximal distance during the third week (+26% compared with the average distance of the 12 weeks) once isolated in an individual cage. Through the fourth and fifth week, the running distance was still greater than the average distance (+16.4% and +9.6%, respectively, compared with the average distance of the 12 weeks). In the sixth week, the running distance plateaued for three weeks (distance run is equal to the average distance) and was significantly lower than the distance run at week 3. Finally, the shortest running distance was reached in the 11th week (-49% compared with the average distance of the 12 weeks).

**Heart parameters**

During MRI, the heart rate was maintained and no difference was observed between the CON and VWR groups (414.1 ± 10.4 and 417.2 ± 16.2 bpm respectively; P = 0.62). Figure 2a depicts short-axis MR images acquired in the center of the heart in CON and VWR mice. Quantitative

**Table 1** Animals characteristics in control (CON) or voluntary wheel running (VWR) mice during the 12-week protocol

	CON (n = 10)	VWR (n = 10)	P
Body weight (g)	26.66 ± 0.36	26.95 ± 0.29	0.680
Water consumption/week (g)	32.00 ± 1.03	41.53 ± 1.22	0.0003*
Food consumption /week(g)	31.06 ± 0.57	38.21 ± 1.11	0.0002*
Distance run/week (km)	-	37.46 ± 2.35	-
Time run/week (h:min:s)	-	35:19:14 ± 06:22:09	-

Values are means ± SE

\*P < 0.05 (VWR versus CON)

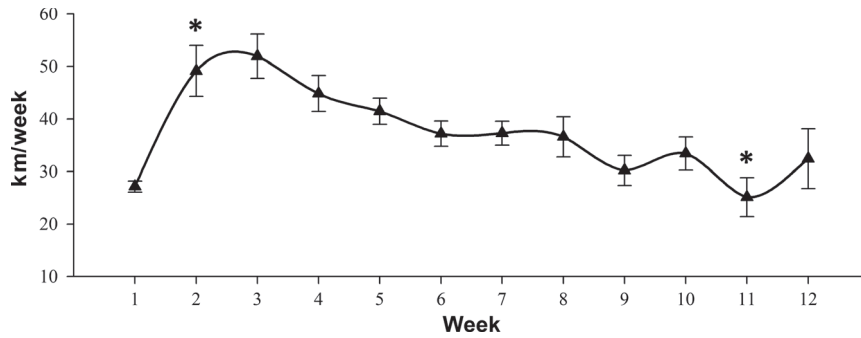


Figure 1 Distance ran per week in voluntary wheel running C57Bl/6 mice (n = 10). Values are means ± SE. \*P < 0.05 (versus previous week)

MRI results for the cardiac morphometric and functional indices are summarized in Figure 2b. The LV wall mass and LV wall mass/body weight (BW) ratio were significantly higher in the VWR group ( $92.11 \pm 3.06$  mg and  $3.44 \pm 0.13$  mg/g, respectively) compared with the control mice ( $77.61 \pm 4.58$  mg and  $2.96 \pm 0.17$  mg/g,  $P < 0.05$ ). The EDV, ESV and SV also presented higher values for the running wheel mice compared with the control mice (+20.32% for EDV; +44.9% for ESV; +17.1% for SV;  $P < 0.05$ ). However, the EF (Figure 2b,  $P = 0.12$ ) and the LV remodeling index ( $1.91 \pm 0.11$  for CON mice and  $1.80 \pm 0.08$  g/mL for VWR mice,  $P = 0.52$ ) did not differ among the two groups.

Postmortem analysis, as presented in Figure 3, showed significant increases in the heart weight to body weight ratio (HW/BW) and in the LV weight to body weight ratio (LVW/BW) in the VWR group compared with the CON group (+12.4% and +20.8%, respectively).

**Muscle characteristics and enzyme activities**

Table 2 shows the skeletal muscle enzyme activities and weight from the soleus and TA in the two groups. Measurements were performed on 10 mice per group,

except for the exclusion of one CON soleus muscle due to a technical problem during the dissection. An increase in muscle weight and the muscle weight/body weight ratio was observed in the VWR group compared with the CON group in the soleus as well as in TA ( $P < 0.05$ ; Table 2). Furthermore, whereas no differences in SDH activity in both the muscles and in COx activity in the TA were observed between the two groups, VWR mice exhibited higher COx activity in the soleus compared with the CON mice (+28.8%;  $P < 0.05$ ).

**Relationships between MRI and biochemical parameters**

The relationships between the enzymology, MRI heart parameters (LV wall mass/BW and EDV) and heart, and muscle postmortem parameters (LVW/BW and soleus weight/BW) are shown in Figure 4. A positive correlation was observed between the MRI LV wall mass and the post-mortem LVW ( $P = 0.719$  and  $0.005$ ; data not shown) as well as between the MRI LV wall mass/BW ratio and the post-mortem LVW/BW ( $r = 0.671$ ;  $P = 0.017$ ; Figure 4a). The MRI EDV tended to be related to the postmortem soleus weight/BW ratio ( $r = 0.663$ ;  $P = 0.026$ ; Figure 4b) and

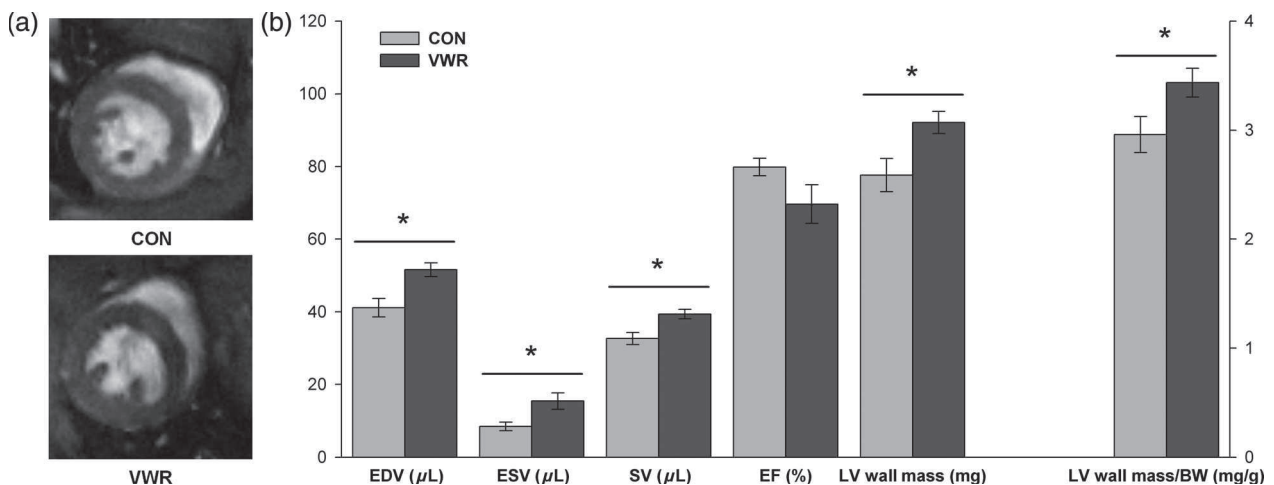
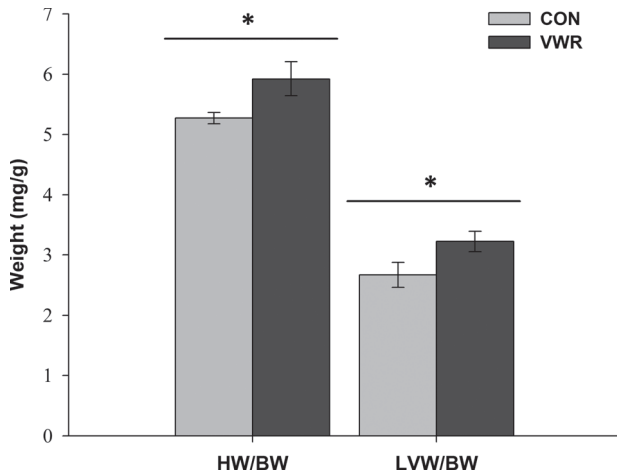


Figure 2 Representative short-axis midventricular magnetic resonance images acquired in control (CON; n = 6) and voluntary wheel running (VWR; n = 6) mice. The VWR heart in (a) is characterized by an enlarged LV chamber volume and a greater myocardial mass (b) ( $92.11 \pm 3.06$  mg for the VWR group compared with  $77.61 \pm 4.58$  mg for the CON group). Values are means ± SE. VWR, voluntary wheel running; EDV, end-diastolic LV chamber volume; ESV, end-systolic LV chamber volume; SV, stroke volume; EF, ejection fraction; LV, left ventricle; BW, body weight. \*  $P < 0.05$  (VWR versus CON)



**Figure 3** Postmortem heart and LV weights in control (CON;  $n = 10$ ) or voluntary wheel running (VWR;  $n = 10$ ) C57Bl/6 mice. Values are means  $\pm$  SE. HW/BW, heart weight/body weight; LVW/BW, left ventricular weight/body weight. \* $P < 0.05$  (CON versus VWR)

additionally, the COx activity in the soleus and was statistically related to the MRI LV wall mass/BW ( $r = 0.718$ ;  $P = 0.013$ ; Figure 4c) and to the postmortem LVW/BW ratio ( $r = 0.556$ ;  $P = 0.016$ ; Figure 4d).

**Discussion**

The purpose of the study was to validate an *in vivo* cardiac MRI method in order to evaluate the training level of mice. Following the 12-week running wheel session, it was observed that exercise training induced physiological modifications in heart and lower limb muscles, and that MRI was sufficiently sensitive to detect these variations in the heart. Indeed, it was observed that there was: (1) an increase in the postmortem whole heart, left ventricle, soleus and TA weights; (2) an increase in MRI heart parameters such as LV wall mass, EDV, ESV and SV; (3) an increase in enzymatic activities such as that of COx; and (4) COx activity in the soleus and LVW/BW were correlated to LV wall mass/BW obtained with MRI.

As cardiovascular adaptations are among the most important responses to physical activity,<sup>4,13,32</sup> we chose to evaluate heart anatomical and functional changes using proton MRI.

MRI offers the possibility of examining *in vivo* organs but is often associated with additional technical difficulties in mice, as opposed to rats,<sup>33</sup> because of the frequency of their cardiorespiratory movements. The double realtime cardiorespiratory gating system used here and developed by Sabbah *et al.*<sup>1</sup> and Alsaïd *et al.*,<sup>26</sup> allowed us to reconstruct high-resolution heart images throughout the cardiac revolution.<sup>1</sup> Other options using self-gated MRI methods<sup>34</sup> and parallel imaging techniques<sup>35</sup> may further facilitate manipulation for longitudinal MRI follow-up in mice.

Our results show that the LV wall mass measured with MRI was increased in VWR mice compared with CON mice and was related to both the COx activity in the soleus and to the postmortem LVW/BW ratio (Figures 4a-c). In addition, the cardiac work capacity notably evaluated by MRI (EDV) was related to the soleus weight and the soleus weight/BW ratio (Figure 4b). The increase in COx activity and organ weight (heart, LV, soleus and TA) are often used as markers of the training level in many models.<sup>4,18,19,32,36,37</sup> Therefore, the existence of a significant correlation between the postmortem markers and the *in vivo* MRI measurement supports cardiac MRI as a sensible choice of technique for the detection of cardiac adaptations to exercise training in mice. Indeed, the MRI LV mass was slightly but not significantly higher than the postmortem LV mass ( $84.9 \pm 3.4$  and  $81.7 \pm 6.1$  mg, respectively), as was already observed in other animal models.<sup>38,39</sup>

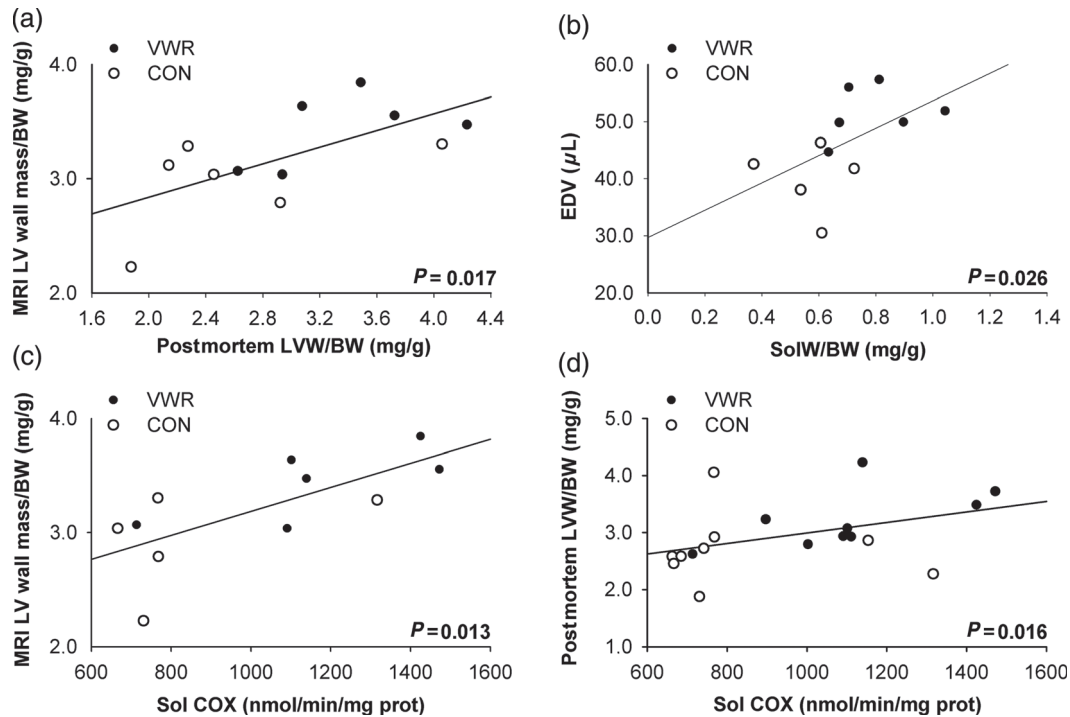
The first major interest in using this technique is that it allows for the evaluation of the cardiovascular effects of exercise training in mice without euthanasia, making it possible to continue the training protocol if adaptations are not significant. Adaptation to exercise training is known to differ between mouse strains,<sup>40,41</sup> so the present MRI technique could be applied to determine the unknown adaptive capacity of numerous cardiovascular transgenic mouse models to habitual exercise. It can also be used to explore, *in vivo*, the benefits of novel pharmacological agents on mouse running capacity. Another interest is that this method makes it possible to decrease the number of animals sacrificed per study as observed by us and others.<sup>3,33-35</sup> Whereas 10 animals per group were necessary to obtain a significant difference between the VWR and the CON mice using *ex vivo* measurements (enzymology, organ weight), only six animals per group were used according to

**Table 2** Soleus and tibialis anterior (TA) mass and enzymatic characteristics in control (CON) or voluntary wheel running (VWR) C57Bl/6 mice

		CON	VWR	% increase	P
Muscle mass (mg)	Sol	15.75 $\pm$ 0.79	19.61 $\pm$ 1.32	+19.69%	0.013*
	TA	35.93 $\pm$ 3.15	47.94 $\pm$ 4.10	+25.05%	0.044*
Ratio muscle mass/BW (mg/g)	Sol	0.59 $\pm$ 0.03	0.73 $\pm$ 0.05	+19.35%	0.038*
	TA	1.35 $\pm$ 0.13	1.79 $\pm$ 0.16	+24.39%	0.011*
COx activity (nmol/min/mg prot)	Sol	771.7 $\pm$ 56.5	1 105.7 $\pm$ 78.7	+28.8%	0.047*
	TA	637.8 $\pm$ 64.4	737.4 $\pm$ 59.3	+13.5%	0.34
CS activity (nmol/min/mg prot)	Sol	21.5 $\pm$ 1.5	23.6 $\pm$ 3.2	+4.9%	0.33
	TA	8.1 $\pm$ 0.3	8.4 $\pm$ 0.3	+3.41%	0.46
SDH activity (nmol/min/mg prot)	Sol	2.37 $\pm$ 0.17	3.66 $\pm$ 1.29	+35.3%	0.68
	TA	1.16 $\pm$ 0.08	1.22 $\pm$ 0.09	+4.8%	0.83

BW, body weight; COx, cytochrome c oxidase; CS, citrate synthase; SDH, succinate dehydrogenase; Sol: Soleus (CON:  $n = 9$  and VWR:  $n = 10$ ); TA: tibialis anterior (CON and VWR:  $n = 10$ )  
 Values are means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$  (CON versus VWR)





**Figure 4** Correlations between parameters measured in control (CON) or voluntary wheel running (VWR) C57Bl/6 mice. (a) MRI LVM/BW related to the postmortem LVW/BW ratio ( $n = 6$ ); (b) end-diastolic volume (LV chamber) related to soleus weight/BW ratio; (c) MRI LVM/BW related to COx activity in soleus muscle; (d) postmortem LVW/BW ratio related to the COx activity in soleus muscle. MRI LVM/BW, magnetic resonance imaging left ventricular wall mass/body weight (CON and VWR:  $n = 6$ ); LVW/BW, left ventricular weight/body weight (CON and VWR:  $n = 10$ ); EDV, end-diastolic volume (CON and VWR:  $n = 6$ ); SolW/BW, soleus weight/body weight (CON:  $n = 9$  and VWR:  $n = 10$ ); Sol COx, cytochrome c oxydase activity in soleus (CON:  $n = 9$  and VWR:  $n = 10$ )

the *in vivo* MRI method. This kind of animal experiment is in accordance with the recommendations of the international animal care committees. Moreover, as six of the 10 mice performed MRI, we further showed that anesthesia had no effect on the enzymatic results, i.e. in each group, there was no significant difference between mice with MRI and those without.

In this study, the use of VWR in mice was chosen because it is a widely used and approved method to obtain a trained mouse model. This voluntary training model is often preferred to swimming exercise or forced treadmill training because the latter is associated with chronic stress including the releasing of stress hormones.<sup>42</sup> Several authors have shown that in free wheel activity, mice run sufficiently to produce physiological adaptations observed with aerobic training, such as cardiac hypertrophy<sup>4,18,19</sup> and better muscle oxidative capacity.<sup>5,20–22,24,25,28,29</sup> This is confirmed in the present study where 12 weeks of physical activity were associated with heart and LV hypertrophy (Figure 2) as well as musculoskeletal changes (Table 2). The left ventricle hypertrophy observed in trained mice was defined as ‘symmetric’ because the LV remodeling index was similar between the CON and VWR mice. The definition of this characteristic is an increase in cavity dimension and volume accompanied by an increase in thickness and mass of the ventricles without modification of LV geometry.<sup>27</sup> This is in agreement with studies on elite triathletes, soccer players and rowers where there was no difference between their control and trained groups.<sup>27,36,43</sup>

Wheel running in mice was shown to increase muscle mass (TA and Sol), muscle mass/BW ratio and the COx activity in soleus. Because soleus is an oxidative muscle,<sup>44</sup> the increase in COx activity in the soleus implies that the wheel running was responsible for enhancing the efficiency of the COx activity and consequently the oxidative capacity,<sup>30</sup> but not the amount of functional mitochondria. Indeed, CS and SDH, Krebs cycle enzymes which reflect the amount of functional mitochondria, did not increase.<sup>30</sup> The oxidative capacity of the TA does not seem to be influenced by the wheel running either. Our results are in contrast with Allen *et al.*<sup>4</sup> who observed, in the TA, a shift of the muscle fibers from the glycolytic IIb and IIc fibers to the more oxidative IIa fibers after only four weeks of wheel running, which should have modified the oxidative capacity of the muscle.<sup>4</sup> These discrepancies could be explained by the average running distance and running intensity. A longer running distance, as presented in the Allen *et al.* study,<sup>4</sup> is sufficient to induce a shift in the TA, while a running intensity inferior to 50% of maximal oxygen consumption, as suggested by Dudley *et al.*,<sup>45</sup> may not elicit an adaptation in mitochondrial content, particularly in fast-twitch like TA. These combined observations may explain our results.

This study had several limitations. First, there were no baseline MRI measurements before the eight weeks of VWR. As C57Bl/6 are inbred, it is well accepted that at the same age, the variability in weight and organic development is very low (as observed in the present study in

CON mice). In addition, mice from the two groups were randomly divided at the beginning of the protocol to overcome this issue. The second limitation is the use of 1.5–2% isoflurane during MRI. Kober *et al.*<sup>46</sup> showed that with isoflurane levels between 1.25% and 2%, myocardial blood flow changes may modulate the heart hemodynamics. For MRI acquisition considerations (i.e. 15–17 frames per cardiac cycle), we chose to adjust isoflurane concentration to maintain comparable heart rate between mice. As they were inbred mice, we hypothesized that they need approximately the same isoflurane concentration. Indeed, there was no difference between groups in isoflurane concentration to maintain stable heart rate during acquisition. However, as the heart rate was artificially maintained by isoflurane, this measurement could not be used as a physiological parameter enabling to calculate cardiac output.

In conclusion, we have demonstrated that *in vivo* MRI results are related to *ex vivo* anatomical and biochemical adaptations to exercise training. As a result, MRI seems to be a valid methodology that could allow researchers to both reduce the number of animals required, and to perform a longitudinal follow-up of the heart hypertrophy/training level coupled with other organic characteristics by MRI.

**Author contributions:** All authors participated in interpretation of the results and review of the manuscript. EC-S, CM and HA participated in the study design; AB, MS, EA and FS conducted the MRI experiment; GDS, EA and EC conducted the postmortem experiments; and EA, CM, EC-S and HA wrote the manuscript. CM and EC-S equally contributed to the supervision of this work.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported by Rhône-Alpes Region and CNRS Small Animal Imaging program grants.

**REFERENCES**

- 1 Sabbah M, Alsaïd H, Fakri-Bouchet L, Pasquier C, Briguet A, Canet-Soulas E, Fokapu O. Real-time gating system for mouse cardiovascular MR imaging. *Magn Reson Med* 2007;**57**:29–39
- 2 Bessaad A, Sigovan M, Alsaïd H, De Souza G, Provost N, Majd Z, Menager C, Honnorat J, Lagarde F, Nighoghossian N, Nataf S, Canet-Soulas E. M1-activated macrophages migration, a marker of aortic atheroma progression. *Invest Radiol* 2010;**45**:262–9
- 3 Sigovan M, Bessaad A, Alsaïd H, Lancelot E, Corot C, Neyran B, Provost N, Majd Z, Breisse M, Canet-Soulas E. Assessment of age modulated vascular inflammation in ApoE –/– mice by USPIO-enhanced magnetic resonance imaging. *Invest Radiol* 2010;**45**:702–7
- 4 Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol* 2001;**90**:1900–8
- 5 Davidson SR, Burnett M, Hoffman-Goetz L. Training effects in mice after long-term voluntary exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2006;**38**:250–5
- 6 Adamopoulos S, Parissis JT, Kremastinos DT. New aspects for the role of physical training in the management of patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2003;**90**:1–14
- 7 Zoppini G, Targher G, Zamboni C, Venturi C, Cacciatori V, Moghetti P, Muggeo M. Effects of moderate-intensity exercise training on plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in older patients with type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;**16**:543–9
- 8 Adamopoulos S, Parissis J, Karatzas D, Kroupis C, Georgiadis M, Karavolias G, Paraskevaidis J, Koniavitu K, Coats AJS, Kremastinos DT.

Physical training modulates proinflammatory cytokines and the soluble Fas/soluble Fas ligand system in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2002;**39**:653–63

- 9 Adamopoulos S, Parissis J, Kroupis C, Georgiadis M, Karatzas D, Karavolias G, Koniavitu K, Coats AJ, Kremastinos DT. Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 2001;**22**:791–7
- 10 Clarkson P, Montgomery HE, Mullen MJ, Donald AE, Powe AJ, Bull T, Jubb M, World M, Deanfield JE. Exercise training enhances endothelial function in young men. *J Am Coll Cardiol* 1999;**33**:1379–85
- 11 Kavazis AN. Exercise preconditioning of the myocardium. *Sports Med* 2009;**39**:923–35
- 12 Petersen A, Pedersen B. The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. *J Physiol Pharmacol* 2006;**57**:43–51
- 13 Matsumoto Y, Adams V, Jacob S, Mangner N, Schuler G, Linke A. Regular exercise training prevents aortic valve disease in low-density lipoprotein-receptor-deficient mice. *Circulation* 2010;**121**:759–67
- 14 Belardinelli R, Cianci G, Gigli M, Mazzanti M, Lacalaprice F. Effects of trimetazidine on myocardial perfusion and left ventricular systolic function in type 2 diabetic patients with ischemic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;**51**:611–5
- 15 Ponikowski P, Anker SD, Szachniewicz J, Okonko D, Ledwidge M, Zymliński R, Ryan E, Wasserman SM, Baker N, Rosser D, Rosen SD, Poole-Wilson PA, Banasiak W, Coats AJS, McDonald K. Effect of darbepoetin alfa on exercise tolerance in anemic patients with symptomatic chronic heart failure: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 2007;**49**:753–62
- 16 Barrick CJ, Rojas M, Schoonhoven R, Smyth SS, Threadgill DW. Cardiac response to pressure overload in 129S1/SvImJ and C57BL/6J mice: temporal- and background-dependent development of concentric left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;**292**:H2119–30
- 17 Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ, Mendelsohn ME, Konstam MA. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998;**274**:H1812–20
- 18 Momken I, Lechêne P, Koulmann N, Fortin D, Mateo P, Doan BT, Hoerter J, Bigard X, Veksler V, Ventura-Clapier R. Impaired voluntary running capacity of creatine kinase-deficient mice. *J Physiol* 2005;**565**:951–64
- 19 Konhilas JP, Maass AH, Luckey SW, Stauffer BL, Olson EN, Leinwand LA. Sex modifies exercise and cardiac adaptation in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;**287**:H2768–76
- 20 Landisch RM, Kosir AM, Nelson SA, Baltgalvis KA, Lowe DA. Adaptive and nonadaptive responses to voluntary wheel running by mdx mice. *Muscle Nerve* 2008;**38**:1290–303
- 21 Houle-Leroy P, Garland T, Swallow JG, Guderley H. Effects of voluntary activity and genetic selection on muscle metabolic capacities in house mice *Mus domesticus*. *J Appl Physiol* 2000;**89**:1608–16
- 22 Jørgensen SB, Treebak JT, Viollet B, Schjerling P, Vaulont S, Wojtaszewski JFP, Richter EA. Role of AMPK $\alpha$ 2 in basal, training-, and AICAR-induced GLUT4, hexokinase II, and mitochondrial protein expression in mouse muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;**292**:E331–9
- 23 Durrant JR, Seals DR, Connell ML, Russell MJ, Lawson BR, Folan BJ, Donato AJ, Lesniewski LA. Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and down-regulation of NADPH oxidase. *J Physiol* 2009;**587**:3271–85
- 24 Röckl KSC, Hirshman MF, Brandauer J, Fujii N, Witters LA, Goodyear LJ. Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift. *Diabetes* 2007;**56**:2062–9
- 25 Zhan WZ, Swallow JG, Garland T, Proctor DN, Carter PA, Sieck GC. Effects of genetic selection and voluntary activity on the medial gastrocnemius muscle in house mice. *J Appl Physiol* 1999;**87**:2326–33
- 26 Alsaïd H, Sabbah M, Bendahmane Z, Fokapu O, Felblinger J, Desbleds-Mansard C, Corot C, Briguet A, Crémillieux Y, Canet-Soulas E. High-resolution contrast-enhanced MRI of atherosclerosis with digital cardiac and respiratory gating in mice. *Magn Reson Med* 2007;**58**:1157–63
- 27 De Castro S, Pelliccia A, Caselli S, Di Angelantonio E, Papetti F, Cavarretta E, Carbone I, Francone M, Passariello R, Pandian NG, Fedele F. Remodelling of the left ventricle in athlete’s heart: a three dimensional

- echocardiographic and magnetic resonance imaging study. *Heart* 2006;**92**:975–6
- 28 Vainshtein A, Kazak L, Hood DA. Effects of endurance training on apoptotic susceptibility in striated muscle. *J Appl Physiol* 2011;**10**:1638–45
- 29 Seebacher F, Glanville EJ. Low levels of physical activity increase metabolic responsiveness to cold in a rat (*Rattus fuscipes*). *PLoS One* 2010;**5**:e13022
- 30 Duclos M, Martin C, Malgat M, Mazat JP, Chaouloff F, Mormède P, Letellier T. Relationships between muscle mitochondrial metabolism and stress-induced corticosterone variations in rats. *Eur J Physiol* 2001;**443**:218–26
- 31 Shepherd D, Garland PB. The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J* 1969;**114**:597–610
- 32 Huang C-C, Lin T-J, Chen C-C, Lin W-T. Endurance training accelerates exhaustive exercise-induced mitochondrial DNA deletion and apoptosis of left ventricle myocardium in rats. *Eur J Appl Physiol* 2009;**107**:697–706
- 33 Loganathan R, Bilgen M, Al-Hafez B, Zhero SV, Alenezy MD, Smirnova IV. Exercise training improves cardiac performance in diabetes: *in vivo* demonstration with quantitative cine-MRI analyses. *J Appl Physiol* 2007;**102**:665–72
- 34 Bovens SM, Te Boekhorst BCM, Ouden K, van de Kolk KWA, Nauwerth A, Nederhoff MGJ, Pasterkamp G, Ten Hove M, van Echteld CJA. Evaluation of infarcted murine heart function: comparison of prospectively triggered with self-gated MRI. *NMR Biomed* 2010;**24**:307–15
- 35 Schneider JE, Lanz T, Barnes H, Stork L-A, Bohl S, Lygate CA, Ordidge RJ, Neubauer S. Accelerated cardiac magnetic resonance imaging in the mouse using an eight-channel array at 9.4 Tesla. *Magn Reson Med* 2011;**65**:60–70
- 36 Scharf M, Brem MH, Wilhelm M, Schoepf UJ, Uder M, Lell MM. Cardiac magnetic resonance assessment of left and right ventricular morphologic and functional adaptations in professional soccer players. *Am Heart J* 2010;**159**:911–8
- 37 Turpeinen AK, Kuikka JT, Vanninen E, Vainio P, Vanninen R, Litmanen H, Koivisto VA, Bergström K, Uusitupa MI. Athletic heart: a metabolic, anatomical, and functional study. *Med Sci Sports Exerc* 1996;**28**:33–40
- 38 Katz J, Whang J, Boxt LM, Barst RJ. Estimation of right ventricular mass in normal subjects and in patients with primary pulmonary hypertension by nuclear magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* 1993;**21**:1475–81
- 39 Mitchell AD, Scholz AM, Wange PC, Song H. Body composition analysis of the pig by magnetic resonance imaging. *J Anim Sci* 2001;**79**:1800–13
- 40 Eisenmann JC, Wickel EE, Kelly SA, Middleton KM, Garland T. Day-to-day variability in voluntary wheel running among genetically differentiated lines of mice that vary in activity level. *Eur J Appl Physiol* 2009;**106**:613–9
- 41 Lerman I, Harrison BC, Freeman K, Hewett TE, Allen DL, Robbins J, Leinwand LA. Genetic variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains. *J Appl Physiol* 2002;**92**:2245–55
- 42 Moraska A, Deak T, Spencer RL, Roth D, Fleshner M. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;**279**:R1321–9
- 43 Scharf M, Brem MH, Wilhelm M, Schoepf UJ, Uder M, Lell MM. Atrial and ventricular functional and structural adaptations of the heart in elite triathletes assessed with cardiac MR imaging. *Radiology* 2010;**257**:71–9
- 44 Soukup T, Zacharova G, Smerdu V. Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats. *Acta Histochem* 2002;**104**:399–405
- 45 Dudley GA, Abraham WM, Terjung RL. Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1982;**53**:844–50
- 46 Kober F, Iltis I, Cozzone PJ, Bernard M. Myocardial blood flow mapping in mice using high-resolution spin labeling magnetic resonance imaging: influence of ketamine/xylazine and isoflurane anesthesia. *Magn Reson Med* 2005;**53**:601–6

(Received February 1, 2011, Accepted November 7, 2011)

---

### **Etude n°3 : Le stress d'hypoxie/réoxygénation stimule certains marqueurs impliqués dans la crise vaso-occlusive chez les souris drépanocytaires SAD**

---

E.Aufradet, G.DeSouza, V.Bourgeaux, A.Bessaad, Y.Campion, E.Canet-Soulas, EN.Chirico, AM.Chevrier, Y.Godfrin and C.Martin.

A soumettre dans *British Journal of Haematology* en 2012.

---

La souris SAD présente une physiopathologie de la drépanocytose peu sévère à l'état stable expliquée par une concentration en HbS d'environ 19%, ce qui est assez éloigné des 95% d'HbS chez les sujets drépanocytaires. Cependant, comme cela est décrit dans la revue de littérature ( A. partie1.III.1.i ; p 37), le transgène  $\beta^{SAD}$ , constitué de l'assemblage de trois mutations, augmente la sévérité de la mutation HbS et rend les GR beaucoup plus sensibles à la désoxygénation (127). Cela provoque chez les souris SAD le développement de crises vaso-occlusives lorsque l'animal est soumis à un stress d'hypoxie/réoxygénation. C'est dans ce cadre que cette expérimentation a été mise en place. Le but de cette étude était donc de s'assurer que le stress d'H/R permettait bien la mise en place de perturbations vasculaires pouvant mener aux CVO et d'identifier quels marqueurs de l'adhérence vasculaire et du stress-oxydatif pouvait être influencés par ce stress d'H/R. Ainsi, des souris SAD ou contrôles C57Bl/6 ont été soumises où non à un stress d'H/R consistant en 4h d'hypoxie à 6,5% d'O<sub>2</sub> suivi par 2h ou 6h de réoxygénation. Les deux temps de réoxygénation ont été choisis afin de déceler des différences dans l'évolution des marqueurs de la CVO. Le stress d'H/R a abouti à une diminution de l'hématocrite, du volume globulaire moyen et de la quantité de réticulocytes couplée à une augmentation de la LDH après 6h de réoxygénation. Ces résultats suggèrent une augmentation de l'hémolyse chez les souris SAD. De plus, nous avons observé que les souris SAD, en réponse au stress d'H/R, présentaient : une augmentation de l'expression endothéliale de VCAM-1, du stress oxydatif, des concentrations plasmatiques en TNF- $\alpha$  et IL-6 ainsi que des ARNm codant pour VCAM-1, ICAM-1, IL-1 $\beta$ , ET-1, eNOS et TF. En parallèle, les activités antioxydantes de la GPx et de la catalase étaient diminuées. Le stress d'H/R semble donc déclencher des dysfonctionnements endothéliaux et systémiques chez les souris SAD. L'hémolyse accrue pourrait être impliquée dans la production délétère de ROS pouvant participer à l'augmentation du stress-oxydatif, de l'inflammation et à une activation endothéliale anormale. Le stress d'H/R utilisé permet



donc de stimuler, chez les souris SAD, des mécanismes moléculaires participant à la formation des CVO. Celles-ci n'ont cependant pas été observées au niveau tissulaire, probablement du fait d'une durée d'H/R est trop courte pour arriver à des modifications anatomiques. Des congestions rénales et pulmonaires ont en effet été observées pour des durées d'hypoxie de 18 à 48h à 8% d'oxygène et un temps de réoxygénation de 1h à 2h (130,134,642). Ce type de stress hypoxique n'a cependant pas été choisi dans nos études car il induisait une trop grande hétérogénéité de réponse chez nos souris du point de vue de l'expression des ARNm.

Cette étude nous permet donc de disposer d'un modèle de souris transgénique drépanocytaire présentant des dysfonctionnements endothéliaux impliqués dans les CVO suite à un stress d'H/R. Ce protocole a été par la suite utilisé pour déterminer les effets de nouveaux procédés thérapeutiques sur le développement de la CVO : nous avons ainsi testé les effets de l'activité physique volontaire (étude 4) et de l'injection de GR encapsulant de l'Inositol HexaPhosphate (IHP, un effecteur allostérique de l'Hb) chez les souris SAD. Les résultats de ce dernier travail sont présentés dans l'article en annexe 2.

## Hypoxia/reoxygenation stress increase markers of vaso-occlusive crisis in sickle SAD mice

E.Aufradet<sup>1</sup>, G.DeSouza<sup>1</sup>, V.Bourgeaux<sup>2</sup>, A.Bessaad<sup>1</sup>, Y.Campion<sup>2</sup>, E.Canet-Soulas<sup>3</sup>, EN.Chirico<sup>1,3</sup>, AM.Chevrier<sup>2</sup>, Y.Godfrin<sup>2</sup> and C.Martin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EA 647 Center of Research and Innovation on Sports, University Claude Bernard Lyon 1, University of Lyon, Lyon, France; <sup>2</sup> ERYTECH Pharma, Lyon, France; <sup>3</sup>INSERM U1060, Laboratory CarMeN, University Claude Bernard Lyon 1, University of Lyon, Lyon, France.

**Abstract:** The sickling of the red blood cells (RBCs) in sickle cell disease (SCD) participates in vascular occlusion. Other factors such as inflammation, vascular adhesion, oxidative stress, coagulation, and vascular tone modulation are also involved in vasoocclusive crisis (VOC). SAD mice are sickle transgenic models, in which VOC are triggered by a hypoxia/reoxygenation (H/R) stress. The aim of this study was to further characterize the molecular response of factors involved in VOC during a hypoxic stress followed by two length of reoxygenation (2 or 6h) in SAD mice. Results in SAD mice show: 1) a decrease in reticulocytes count, hematocrit, and mean corpuscular volume as an increase of LDH and sickled cell proportion after 6h of post-hypoxia reoxygenation; 2) a significant increase in lung mRNA encoding for VCAM-1, ICAM-1, IL-1b, ET-1, eNOS, and TF after 2h of reoxygenation associated with a continuous increase in VCAM-1 expression on lung endothelium (baseline<2h<6h); 3) a rise in oxidative stress with increased lipid oxidation and decreased anti-oxidant enzyme activities, and 4) an increase in plasma TNF- $\alpha$  and IL-6 after 6h of reoxygenation and a decrease in plasma ET-1 during the reoxygenation time. In SAD mice, H/R stress induces hemolysis that, together with oxidative stress, inflammation, vascular adhesion molecules and coagulation, may induce vascular occlusion and consequently RBC sickling. The present results give the kinetics of VOC molecular markers in SAD mice enabling us to test the efficiency of new therapeutical processes against VOC.

**Introduction:**

Sickle cell disease (SCD) is a genetic disorder caused by a single mutation on the  $\beta$ -globin gene (1). The deoxygenation of sickle hemoglobin (HbS, in contrast to normal hemoglobin: HbA) by hypoxia, acidosis or dehydration leads to the sickling of red blood cells (RBCs) (1). Vaso-occlusive crisis (VOC) is one of the most important and problematic symptom of this hereditary disease and seems to be caused by a multifactorial process which involve inflammation, vascular adhesion, oxidative stress, coagulation, and abnormal vascular tone modulation (2). This may lead to episodes of stroke, acute chest syndrome, osteonecrosis, or painful crises which may be very disabling for the SCD subjects (2-4).

In the case of clinical or fundamental research, the use of transgenic SCD mice is helpful in both understanding the VOC mechanisms and testing the effects of some therapeutic processes on the vascular occlusion development. Experimentally, this means that VOC have to be induced in the SCD mice, with many studies selecting a hypoxia/reoxygenation stress. This choice is made for two reasons: 1) hypoxia stimulates the sickling of the RBCs, which is the first event involved in the vascular occlusion formation and leads to decreased blood flow and tissue oxygenation (5) and 2) the reoxygenation period activates stressful reperfusion mechanisms. During reperfusion, restoration of blood flow and oxygenation is known to stimulate oxidative stress (6-8), inflammation (9-10), vascular adhesion (7,11-12), coagulation (13-14), and an abnormal modulation of vascular tone (15-18). Thus, H/R stress activates the main factors involved in the VOC in SCD (2).

In the sickle SAD mice model (19), H/R stress is a known inductor of VOC. Consequently, some organic damages have been observed in the lungs with thrombi and vascular congestion, in the liver with hepatocellular damages, and in the kidney with decreased blood flow velocity suggesting VOC and vascular congestion (20-24). However, molecular mechanisms and kinetics of VOC associated markers developed in SAD mice during H/R stress are still poorly evaluated. Thus, the aim of this study was to characterize the response to an acute hypoxic stress followed by two reoxygenation

durations in SAD mice. Blood and tissue markers participating in VOC were analyzed in the field of inflammation, vascular adhesion, oxidative stress, coagulation and modulation of the vascular tone.

### **Material and Methods:**

*Animals:* The *Guide for the care and use of laboratory animals* provided by the Institute for Laboratory Animal Research (National Academy of Sciences, USA) were followed and all animal protocols were approved by the regional animal care committee (Rhône-Alpes, France).

SAD mice (10-15 weeks old) and C57Bl/6J (13 weeks old) were used in this study. SAD mice express the human hemoglobin SAD transgene ( $\alpha_2^{\text{human}}\beta_2^{\text{SAD}}$ ) containing three sickle mutations: D-punjab ( $\beta^{121}\text{Gln}$ ), Antilles ( $\beta^{23}\text{Ile}$ ) and  $\beta^S$  ( $\beta^6\text{Val}$ ) which confer  $\approx 19\%$  of HbSAD (19). This transgene leads the SAD mice to mimic the hypoxia-induced vasoocclusive events of human SCD (20). The C57Bl/6J mice (Charles River, L'Arbresle, France), which are the background of the SAD mice, were used as controls in this experimentation. During the protocol, mice were maintained on a 12h light-dark cycle with food and water *ad libitum*.

*Experimental protocol:* SAD and C57Bl/6 mice were divided into 3 groups for each strain (7 mice/group): one normoxic (SADn or C57n) and two hypoxic groups which were exposed to an acute hypoxia (6.5% oxygen during 4h) followed by 2 hours (SAD-2h or C57-2h) or 6 hours (SAD-6h or C57-6h) reoxygenation in ambient air. Hypoxia was induced by placing mice in a chamber (Biospherix, Redfield, NJ, USA) equipped with an oxygen ( $\text{O}_2$ ) sensor system (Pro-ox, Biospherix, USA) controlling the pure nitrogen gas distribution (Nitrogen 4.5, Linde Gaz s.a, St Priest, France). Oxygen proportion in the chamber was progressively (within 30min) decreased from 21% to 6.5% after the entrance of the mice and then maintained at 6.5%.

*Tissue sampling:* After the end of the reoxygenation period, mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (50mg/Kg, Dolethal®, Vétquinol, Lure, France) and blood was collected by a retro-orbital venipuncture into EDTA tube for hematologic and plasma analysis. Mice were transcardially perfused during 70 seconds with 0.9% NaCl (Sigma-Aldrich, St Louis, MO,

USA). The inferior right lung and the heart were quickly dissected and immediately frozen in liquid nitrogen for RT-qPCR and oxidative stress analysis, respectively. The left lung was dissected and specifically treated for the immunohistologic analysis (see below).

*Hematologic analysis:* Hematocrit (Htc), red blood cells (RBCs), mean corpuscular volume (MCV), white blood cells (WBCs), and platelets were measured in whole blood using an ABX automate (Horiba, Montpellier, France). The proportion of reticulocytes was assessed by flow cytometry using thiazole-orange staining (BD Retic reagent, BD Pharmingen, Oxford, UK). The proportion of sickled cells in whole blood was blindly (two experimenters) counted in 25  $\mu$ l of the suspensions fixed on plastic glass Kova-slides (Dutscher, Brumath, France) with deoxygenated phosphate-buffered glutaraldehyde (2%). The percentage of sickled cells was estimated using at least 500 cells at a magnification x 40 using an Olympus-CX31 microscope (Revol, Lyon, France). Cells that were not biconcave were considered to be sickled.

*RT-qPCR :* Total mRNA from the inferior right lung was isolated using Trizol reagent (Tri Reagent LS, Euromedex, Souffelweyersheim, France) according to the manufacturer instructions, purified with the Ambion® TURBO DNA-free™ (Ambion, Austin, TX, USA) and concentrated at 80 ng/ $\mu$ L. 1000ng per sample of total mRNA were reverse transcribed to cDNA with the reverse transcriptase RNase Hminus (Promega, Madison, WI, USA) using oligo (T)<sub>15</sub>. RT calibration was done in the presence of 80 pg of a synthetic external and nonhomologous poly(A) Standard RNA (SmRNA) used to normalize the reverse transcription of mRNAs of biological samples (Morales and Bezin, patent WO2004.092414). Real-time qPCR analysis was performed on a LightCycler® System (Roche, Penzberg, Germany) by using the Quantitect SYBR®green PCR kit (Qiagen, Venlo, Netherlands). The thermal profiles consisted of 15min at 95°C for denaturing followed by 45 cycles of amplifications (15 sec at 94°C for denaturation, 30 sec at 58°C for annealing and 6 sec at 72°C for extension). Results obtained for the targeted mRNAs were normalized against the SmRNA. The primer pairs used were: *Vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1; NM\_011693.2) forward 5' TGG TGA AAT GGA ATC TGA

ACC 3', reverse 5' CCC AGA TGG TGG TTT CCT T 3' (86 bp); *Intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1 ; NM\_010493.2) forward 5' CCC ACG CTA CCT CTG CTC 3', reverse 5' GAT GGA TAC CTG AGC ATC ACC 3' (72 bp); *Interleukine-1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ; NM\_008361.3) forward 5' TTG ACG GAC CCC AAA AGA T 3', reverse 5' AGC TGG ATG CTC TCA TCA GG 3' (73 bp); *Endothelin-1* (ET-1; NM\_010104.2) forward 5' TTC TCC AGG AAA ACT AAC CAA AA 3', reverse 5' CCA CAA TGA TGA GTG TTT CTC C 3' (85 bp); *Tissue factor/coagulation factor III (F3)* (TF; NM\_010171.3) forward 5' TTC TCC AGG AAA ACT AAC CAA AA 3', reverse 5' CCA CAA TGA TGA GTG TTT CTC C 3' (94 bp); *Endothelial nitric oxide synthase* (eNOS; NM\_008713.4) forward 5' CC AGT GCC CTG CTT CAT C 3', reverse 5' GCA GGG CAA GTT AGG ATC AG 3' (66 bp).

*Immunohistology:* Slides were prepared from the left lung. Tissues were pre-treated after dissection with a tracheal injection of 1/3 cryomatrix (thermoFisher scientific, Waltham, MA, USA) diluted in PBS 1X (VWR, West Chester, PA, USA). Afterward, lung were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in 0.1M phosphate buffer solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) during 2h, then incubated 24h in 25% sucrose (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for cryoprotection and rapidly frozen in -40°C isopentane (VWR, West Chester, PA, USA) before being stored at -80°C. VCAM-1 immunostaining was performed on 7 $\mu$ m frozen sections of the left lung using a Rat monoclonal anti-mouse VCAM-1 diluted at 1:40 (MCA2297GA, serotec AbD, Kidlington, UK). After washes, the sections were then incubated with a Biotinilated Donkey anti-Rat (712-485-153, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) diluted at 1:500. The revelation was performed with the avidin-biotinylated enzyme complex (vectastain Elite ABC standard peroxydase Kit, Vector Lab, Burlingame, CA, USA) and its substrate 3',3-diaminobenzidine (DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Lab, Burlingame, CA, USA). Expression of VCAM-1 was semi-quantified by visual observation of the blood vessels from a slide: for each vessel, a score from 1 to 4 (1: no VCAM-1 immunostaining, 2: less of 25% VCAM-1 expression, 3: less of 50% of VCAM-1 expression, 4: more than 50% of VCAM-1 expression). The VCAM-1 score was, for each mouse, the mean of each vessel score from a slide. Analysis was blindly performed by two investigators under a light microscope (Leitz DIAPLAN

Microscope, Leica, Wetzlar, Germany), and images were captured with a video camera 3CCD (DXC-930P, Sony, Tokyo, Japan) coupled to an image analysis system (Visilog® 6.3, Noesis,).

*Plasma analysis:* Plasma analysis were performed in the SAD-6h and C57-6h mice with 3 successive retro-orbital blood collections: at baseline before the H/R stress, after 2h of reoxygenation and after 6h of reoxygenation before sacrifice. Molecular assays were done with commercial kits for IL-1b (Mouse IL-1 $\beta$  ELISA Max™ Set Standard, Biolegend, San Diego, CA, USA), interleukine-6 (IL-6; Mouse IL-6 ELISA Max™ Set Standard, Biolegend, San Diego, CA, USA), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; Legend Max™ Mouse TNF- $\alpha$  ELISA kit, Biolegend, San Diego, CA, USA), ET-1 (Endothelin-1 ELISA kit, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) and lactate dehydrogenase (LDH; QuantiChrom™ LDH Kit, BioAssay Systems, Hayward, CA, USA). The detection limits were 31.3 pg/mL, 7.8 pg/mL, 15.6 pg/mL, 0.41 pg/mL and 2 IU/L, respectively.

*Oxidative stress:* The heart was homogenized (10%, w/v) in PBS 1X + EDTA 0.5mM in liquid nitrogen. A first centrifugation at 1,500g for 4 min at 4°C permitted to collect the supernatants for malondialdehyde acid (MDA) and protein measurements. A second centrifugation was performed at 12,000g for 10 min at 4°C and the resulting supernatants were used for glutathione peroxydase (GPx) and catalase activity assays. Homogenate aliquots were stored at -80°C. Protein concentrations in lungs were determined using the BCA protein assays Kit (Novagen, Darmstadt, Germany) in accordance to the manufacturer's instructions.

All the products used for oxidative stress measurements came from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Concentrations of baseline plasma MDA were determined as thiobarbituric-reactive substances as previously described (25). The pink chromogen was extracted with n-butanol and MDA concentration was calculated using 1,1,3,3- tetraethoxypropane as standard. GPx activity was determined by the modified method of Paglia and Valentine (26) with hydrogen peroxydase as substrate and reflects the rate of NADPH to NADP<sup>+</sup> oxidation after addition of the glutathione reductase, reduced glutathione and NADPH. Catalase activity was determined as previously

described (27), using hydrogen peroxide as a substrate, and formaldehyde as a standard: activity was determined by the formation rate of formaldehyde induced by the reaction of methanol and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using catalase as enzyme. Spectrophotometry was done with the TECAN Infinite 2000 (Männedorf, Switzerland) and results were reported per mg of total protein.

*Statistics:* All statistical analyses were performed using STASTISTICA v10 (Tulsa, OK, USA). To determine the use of parametric or non-parametric test, normality (Kolmogorov-Smirnov) and variance homogeneity (Fisher) tests were performed. Lung VCAM-1 immunostaining was compared between groups with two-ways ANOVA followed by Fisher post-hoc test. The significant differences among the other non-parametric parameters at the different time points were tested thanks to non parametric Mann-Whitney test. A “p” value inferior to 0.05 was considered statistically significant and the data are expressed as mean ± SE.

### **Results:**

*Hematological characteristics.* At baseline, while hematocrit, RBCs and MCV were lower in the SAD group, WBCs, reticulocytes and platelets were significantly higher in SAD mice than in their C57 counterparts. After hypoxia, hematocrit values tended to decrease after 2h of reoxygenation and 6h of reoxygenation in C57 (p=0.078) and SAD (p=0.11) mice, respectively. The same variations were observed concerning MCV: C57 mice decreased at 2h and 6h compared to C57n, while SAD mice decreased at 6h compared to SADn (p=0.13) and SAD-2h (p<0.05). H/R stress did not induce any WBCs variations in the C57 group but a WBCs decrease was observed in SAD-2h mice compared their SADn counterparts. Reticulocyte proportion inversely changed in response to 6h reoxygenation as it significantly decreased (-28% vs. SADn; p<0.05) and increased (+26% vs C57n; p<0.05) in SAD and C57 mice, respectively. RBCs and platelet concentrations were not different after H/R in the SAD group. In C57 mice, 6h reoxygenation increased the platelets concentrations. Sickled cell percentage, specific to SAD mice, was increased after H/R stress at 6h of reoxygenation (+136% vs SADn; p<0.05).



*Plasma markers of inflammation, vasoconstriction and hemolysis.* Six hours reoxygenation after hypoxia induced higher plasmatic concentrations of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  ( $p=0.1$ ) and TNF- $\alpha$  ( $p<0.05$ ) in SAD mice compared to C57 mice (Figure 1). Moreover, TNF- $\alpha$  concentrations increased significantly in the SAD-6h by comparison with SAD-2h. Plasma IL-6 concentrations were lower in the SAD groups compared to their C57 counterparts after 2h or 6h of reoxygenation. However, in both groups, IL-6 increased at 6h by comparison with the 2h and normoxic conditions ( $p<0.05$ ). Endothelin-1 (ET-1), one of the most potent endothelium-derived vasoconstrictor which participates in the VOC processes, was more concentrated in SAD groups compared to control groups at baseline ( $p=0.07$ ) and 2h after hypoxia ( $p<0.05$ ). Moreover, the plasma ET-1 concentrations significantly decreased after the H/R stress in SAD mice only compared to normoxia values (-30% at 2h and -47% at 6h;  $p<0.05$ ). Lactate dehydrogenase (LDH), a plasma marker of hemolysis, tended to increase after 6h reoxygenation in SAD (vs. SADn,  $p=0.08$  and SAD-2h,  $p=0.1$ ) and C57 (vs. C57-2h,  $p<0.05$ ) groups (Figure 1).

*Oxidative stress.* Baseline results (Table 2) show no statistical difference between C57n and SADn groups for MDA and Catalase but GPx activity was higher in the SAD group compared to C57 group (+25%;  $p<0.05$ ). Results in figure 2 are expressed as percent increase from baseline values and after the H/R stress. Plasma MDA significantly increased in SAD mice after 2h of post-hypoxia reoxygenation compared to SADn while these concentrations decreased in C57 mice after 6h of reoxygenation compared to baseline values ( $p<0.05$  vs C57n and  $p=0.08$  vs C57-2h). Moreover, MDA more importantly increased in SAD-2h and SAD-6h than C57-2h and C57-6h, respectively (Figure 2). Regarding the anti-oxidant enzymes, GPx and catalase activities increased after 6h of reoxygenation compared to 2h ( $p=0.11$ ) in C57 mice, while the contrary was observed in SAD mice: GPx activity tended to decrease 6h post-hypoxia compared to SADn and SAD-2h ( $p=0.08$ ) and catalase activity decreased after 2h of reoxygenation vs. SADn ( $p<0.05$ ). Furthermore, GPx and catalase activities were lowest in the SAD-6h group compared to the C57-6h group ( $p<0.05$  and  $p=0.08$ , respectively) (Figure 2).

*Effect of H/R stress on lung mRNA expression of molecules participating in VOC.* After 2h of reoxygenation, the transgenic SCD mice presented similar variations in several genes encoding for adhesion molecules (VCAM-1, ICAM-1), pro-inflammatory cytokine (IL-1b), coagulation molecule (TF) and vascular tone modulators (eNOS and ET-1) (Table 3 and Figure 3). The number of mRNA copies of these genes significantly increased compared to SADn and SAD-6h ( $p < 0.05$ ). Furthermore, after 6h reoxygenation, these transcripts in SAD mice were higher than in the normoxic conditions except for VCAM-1 ( $p = 0.14$ ). In C57 mice and compared to baseline values, H/R was also associated with an increased number of mRNA encoding for ICAM-1, IL-1 $\beta$ , TF, eNOS (in C57-2h only) and VCAM-1 ( $p = 0.09$ ), ICAM-1 and IL-1 $\beta$  (in C57-6h only). ET-1 in C57 mice was the only gene which was increased at 6h post-hypoxia compared to C57n and C57-2h.

*VCAM-1 immunostaining in the lung after H/R stress.* The results of VCAM-1 expression on the lung vessel walls are presented in figure 4. An increase in VCAM-1 immunostaining was observed in C57 and SAD mice in response to H/R. In control C57 mice, expression of VCAM-1 was only increased after 6h of post-hypoxia reoxygenation (+42% compared to C57n and +48% compared to C57-2h;  $p < 0.05$ ). In SAD mice, this increase was progressive and related to the duration of reoxygenation: VCAM-1 staining in SAD-2h group was significantly higher than in SADn (+58%) and SAD-6h expressed more VCAM-1 than SADn (+121%) and SAD-2h (+40%,  $p < 0.05$ ). Moreover, compared to C57 mice in the same conditions, VCAM-1 expression was higher in SAD mice after 2h and 6h of post-hypoxia reoxygenation (Figure 4).

### **Discussion:**

Vaso-occlusive crisis is a major symptom of SCD and can be very disabling for those with this disease. In order to further characterize an animal model to study this condition, we have examined the dynamic molecular responses of VOC markers to H/R stress in the sickle SAD mice. Association between hypoxic stress and reperfusion mechanisms stimulates VOC in SAD mice. The main results obtained in the present study show that the hematologic disturbances induced by H/R are associated

with plasma and tissue over-expression of mRNA and/or proteins involved in inflammation (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6), vascular adhesion (VCAM-1, ICAM-1), oxidative stress (MDA, GPx and catalase), coagulation (TF), and vasoconstriction (ET-1).

Hypoxia/reoxygenation stress is involved in some modifications of hematologic variables in SAD mice (essentially RBCs). After 6h of post-hypoxia reoxygenation, the decrease proportion of reticulocytes was associated with reductions in hematocrit ( $p < 0.11$ ) and MCV, and with the increase in LDH, a marker of hemolysis. These results suggest a delayed negative effect of hypoxia on the RBCs during the reoxygenation period characterized by an increase in hemolytic processes. Hemolysis is very destructive because it induces the release of hemoglobin and heme into the blood. In addition, the released iron is known to catalyze reactive oxygen species (ROS) production and may contribute to vascular occlusion formation (5). Moreover, an increase in sickled cell proportion after 6h of reoxygenation suggest local hypoxia, probably caused by vascular occlusion, which could stimulate HbS polymerization and RBC sickling.

Hypoxia/reoxygenation induced differential oxidative stress responses in SAD and in C57Bl/6 mice as MDA concentrations increased in SAD and decreased in C57 mice after H/R. In SAD mice, these results may be explained in part by the decrease in anti-oxidant enzyme activities, as observed 2h post-hypoxia for catalase and 6h post-hypoxia for GPx. The increased oxidative stress in SAD mice may be caused either by hemolysis as discussed above or by reperfusion stress which is known to be highly oxidative and to reduce the enzymatic defenses (6-8,28). The present results confirm those of two studies in other models of sickle mice, where H/R stress induced a rise in oxidative stress (29-30). This may involve vascular adhesion and occlusion (29-30), as oxidative stress is known to stimulate the NF $\kappa$ B pathway implicated in cytokine and cell adhesion molecule expression (5).

Vaso-occlusive crisis is due to complex mechanisms which involve many factors including inflammation, vascular adhesion, coagulation, and vascular tone modulation (2). The interesting result of this study is that H/R stress in SAD mice contributes to some of these factors, including a rise in lung VCAM-1 mRNA and protein expression. VCAM-1 is located on the endothelial surface and

contributes to VOC by linking VLA-4 receptors expressed on the WBCs (31) and on stressed reticulocytes (32). Stressed reticulocytes are immature RBCs that are rapidly formed by the bone marrow in response to hemolysis (32). Moreover, mRNA encoding for ICAM-1 was also increased after H/R. ICAM-1 has been demonstrated in SCD to trigger the adhesion of WBCs on the endothelium via the receptors Mac-1 and LFA-1 expressed on the leucocytes surface (31). These increases in cell adhesion molecules (CAM) may generate stasis zones due to increased blood cell adhesion. The increase in cell adhesion can increase RBC transit time, thereby promoting HbS polymerization, sickling of RBCs, and vaso-occlusive episodes (33). The present study supports this as demonstrated by the rise of sickled cell proportion after 6h of reoxygenation. Several studies in SCD mice models using intravital microscopy have observed an increase of the leucocytes/endothelium adhesion after H/R stress (23,30,34). The present VCAM-1 and ICAM-1 data could account for those results. Other CAM, such as selectins, can participate in blood cell adherence to the endothelium. In SCD mice, P-selectin seems to play an important role on leucocytes adhesion, particularly on the initiation of adhesion, *i.e.* "rolling". In fact, intravital microscopy observations demonstrate that inhibition or invalidation of P-selectin in transgenic SCD mice permit to significantly reduce the leucocytes adhesion after H/R stress (30,35).

In parallel to this CAM increase, a significant increase in plasma TNF- $\alpha$  and IL-6 was observed after 6h of reoxygenation while IL-1 $\beta$  remained stable and tended to be higher than the C57 groups. These results confirm those of De Franceschi et al. who observed an increase of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , and IL-6 in the bronchoalveolar fluid after H/R stress (22). TNF- $\alpha$  is a important cytokine involved in reperfusion damage with a cytotoxic effect for stimulating other chemokines (36). Moreover, it participates, along with IL-1 $\beta$ , to the activation of the transcription factor NF $\kappa$ B, which is involved in cell adhesion molecule expression (36-37). The IL-6 cytokine is described as a pro-inflammatory cytokine but it was recently suggested that this molecule should be classified as an anti-inflammatory cytokine because it activates some anti-inflammatory cytokines such as IL-10 or IL-1ra (38). In our study, the H/R stress induced a more significant rise in plasma IL-6 in C57 than in SAD mice. This

effect seen in SAD mice could result in a weaker stimulation of anti-inflammatory mediators after the H/R stress, increasing the inflammatory response, reperfusion stress, and endothelial activation in these mice compared to control mice.

The results presented in this study also indicate a rise of lung TF, eNOS, and ET-1 transcripts and a decrease of plasma ET-1 concentration that nonetheless remain higher after 2 h of reoxygenation in SAD mice compared to C57 mice. We thus confirm the results of two previous studies conducted in other mice models of SCD which observed a rise of endothelial TF expression probably induced by the NF $\kappa$ B(p50) pathway after an H/R stress (39-40). Plasma concentrations and mRNA of the vasoconstrictor ET-1 have not evolved in the same direction after H/R. The plasma ET-1 decrease associated with the ET-1 mRNA increase in lung during reoxygenation could be explained by an inhibition in the translation of mRNA to protein. It could be hypothesized that the inhibition of ET-1 expression is due to nitric oxide (41), a powerful vasodilator produced by eNOS (42). As eNOS mRNA were up-regulated in the present study, one may speculate that NO production was further increased in SAD mice in response to H/R, leading to a decrease in ET-1. However this hypothesis seems unlikely as it has been shown that during VOC nitric oxide bioavailability decrease in sickle mice (42-43) and plasma ET-1 expression increase in SCD patient (44-45). Moreover, in SAD mice, the pharmacologic antagonist of ET-1 receptor, namely bosentan, has been proven to restore blood flow after H/R stress (24), suggesting an involvement of ET-1 in the blood flow disturbances observed in SCD. However, after 2h of post-hypoxia reoxygenation, SAD mice presented higher ET-1 concentrations than C57 mice. This result highlights the fact that vascular tone may be further altered compared to "baseline" conditions, which in combination with other modified factors as seen in this study, could lead to vaso-occlusive

The use of two periods of reoxygenation highlights the importance of adjusting the reoxygenation time after hypoxia according to the observed molecule and to precisely respect this period for each mouse. Indeed, the increase of mRNA encoding for VCAM-1 after 2h of reoxygenation and the increase of VCAM-1 immunostaining after 2h then 6h of reoxygenation

demonstrate the importance of the marker kinetic and a disregard for the period of reoxygenation may mask some effects of the H/R stress.

In conclusion, this model of H/R stress in SAD mice activates certain factors involved in VOC as RBCs sickling, hemolysis, and reperfusion increase the upregulation of pro-inflammatory cytokines, vascular adhesion molecules, oxidative stress, and coagulation factor. Further clarification was necessary to determine how the vascular tone participates in this process. Therefore, this study demonstrates specific VOC markers in this experimental model of SCD that could be used to test new therapeutical approaches and their efficacy in the modulation of VOC intensity in SCD.

**Acknowledge:** We thank Pr. Y.Beuzard (INSERM U733, Paris, France) for providing initial SAD breeding pairs which allowed our lab to develop SAD colony and the French society of hematology for financial support. This study was supported by the French ANR (Agence Nationale pour la Recherche) through a BiotechS project (ANR-08-BIOT-011-01).

**Author contributions:** EA, VB, ECS, FH, YG and CM participated in the design of the study; EA, GDS, VB, AB, YC, AMC conducted the experiments; EA and CM wrote the manuscript and ECS, VB, ENC and YG revised the manuscript.

#### **Bibliography:**

1. **Stuart M,Nagel R.** Sickle-cell disease. *Lancet*, 364: 1343-60 (2004).
2. **Conran N,Costa F F.** Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clin Biochem*, 42: 1824-38 (2009).
3. **Hillery C A,Panepinto J A.** Pathophysiology of stroke in sickle cell disease. *Microcirculation*, 11: 195-208 (2004).
4. **Kato G J,Gladwin M T,Steinberg M H.** Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*, 21: 37-47 (2007).
5. **Belcher J D,Beckman J D,Balla G,Balla J,Vercellotti G.** Heme degradation and vascular injury. *Antioxid Redox Signal*, 12: 233-48 (2010).
6. **Abdallah D M,Nassar N N,Abd-El-Salam R M.** Glibenclamide ameliorates ischemia-reperfusion injury via modulating oxidative stress and inflammatory mediators in the rat hippocampus. *Brain Res*, 1385: 257-62 (2011).
7. **Fujita M,Tsuruta R,Kaneko T,Otsuka Y,Kutsuna S,Izumi T,Aoki T,Shitara M,Kasaoka S,Maruyama I,Yuasa M,Maekawa T.** Hyperoxia suppresses excessive superoxide anion radical generation in blood, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in forebrain ischemia/reperfusion rats: laboratory study. *Shock*, 34: 299-305 (2010).

8. Guven A,Uysal B,Akgul O,Cermik H,Gundogdu G,Surer I,Ozturk H,Korkmaz A. Scavenging of peroxynitrite reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Ren Fail*, 30: 747-54 (2008).
9. Saenz-Morales D,Conde E,Blanco-Sanchez I,Ponte B,Aguado-Fraile E,de Las Casas G,Garcia-Martos M,Alegre L,Escribese M M,Molina A,Santiuste C,Liano F,Garcia-Bermejo M L. Differential resolution of inflammation and recovery after renal ischemia-reperfusion injury in Brown Norway compared with Sprague Dawley rats. *Kidney Int*, 77: 781-93 (2010).
10. Zhang C,Xu X,Potter B J,Wang W,Kuo L,Michael L,Bagby G J,Chilian W M. TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26: 475-80 (2006).
11. Briaud S A,Ding Z M,Michael L H,Entman M L,Daniel S,Ballantyne C M. Leukocyte trafficking and myocardial reperfusion injury in ICAM-1/P-selectin-knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280: H60-7 (2001).
12. Ng C K,Deshpande S S,Irani K,Alevriadou B R. Adhesion of flowing monocytes to hypoxia-reoxygenation-exposed endothelial cells: role of Rac1, ROS, and VCAM-1. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283: C93-102 (2002).
13. Aki H S,Fujita M,Yamashita S,Fujimoto K,Kumagai K,Tsuruta R,Kasaoka S,Aoki T,Nanba M,Murata H,Yuasa M,Maruyama I,Maekawa T. Elevation of jugular venous superoxide anion radical is associated with early inflammation, oxidative stress, and endothelial injury in forebrain ischemia-reperfusion rats. *Brain Res*, 1292: 180-90 (2009).
14. Nishijima K,Kiryu J,Tsujikawa A,Miyamoto K,Honjo M,Tanihara H,Nonaka A,Yamashiro K,Katsuta H,Miyahara S,Honda Y,Ogura Y. Platelets adhering to the vascular wall mediate postischemic leukocyte-endothelial cell interactions in retinal microcirculation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45: 977-84 (2004).
15. Milsom A B,Patel N S,Mazzon E,Tripatara P,Storey A,Mota-Filipe H,Sepodes B,Webb A J,Cuzzocrea S,Hobbs A J,Thiemermann C,Ahluwalia A. Role for endothelial nitric oxide synthase in nitrite-induced protection against renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Nitric Oxide*, 22: 141-8 (2010).
16. Trocha M,Merwid-Lad A,Szuba A,Chlebda E,Piesniewska M,Sozanski T,Szelag A. Effect of simvastatin on nitric oxide synthases (eNOS, iNOS) and arginine and its derivatives (ADMA, SDMA) in ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Pharmacol Rep*, 62: 343-51 (2010).
17. Nagai H,Kato A,Kimura F,Shimizu H,Yoshidome H,Ohtsuka M,Furukawa K,Nozawa S,Yoshitomi H,Mitsuhashi N,Takeuchi D,Suda K,Yoshioka I,Miyazaki M. Endothelin-1 aggravates hepatic ischemia/reperfusion injury during obstructive cholestasis in bile duct ligated mice. *J Surg Res*, 162: 46-53 (2010).
18. LeDoux J F,Tamareille S,Felli P R,Amirian J,Smalling R W. Left ventricular unloading with intra-aortic counter pulsation prior to reperfusion reduces myocardial release of endothelin-1 and decreases infarction size in a porcine ischemia-reperfusion model. *Catheter Cardiovasc Interv*, 72: 513-21 (2008).
19. Trudel M,Saadane N,Garel M C,Bardakdjian-Michau J,Blouquit Y,Guerquin-Kern J L,Rouyer-Fessard P,Vidaud D,Pachnis A,Romeo P H,al e. Towards a transgenic mouse model of sickle cell disease: hemoglobin SAD. *EMBO J*, 10: 3157-65 (1991).
20. Trudel M,De Paepe M E,Chretien N,Saadane N,Jacmain J,Sorette M,Hoang T,Beuzard Y. Sickle cell disease of transgenic SAD mice. *Blood*, 84: 3189-97 (1994).
21. De Franceschi L,Malpeli G,Scarpa A,Janin A,Muchitsch E M,Roncada P,Leboeuf C,Corrocher R,Beuzard Y,Brugnara C. Protective effects of S-nitrosoalbumin on lung injury induced by hypoxia-reoxygenation in mouse model of sickle cell disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 291: L457-65 (2006).
22. De Franceschi L,Baron A,Scarpa A,Adrie C,Janin A,Barbi S,Kister J,Rouyer-Fessard P,Corrocher R,Leboulch P,Beuzard Y. Inhaled nitric oxide protects transgenic SAD mice from sickle cell disease-specific lung injury induced by hypoxia/reoxygenation. *Blood*, 102: 1087-96 (2003).
23. Siciliano A,Malpeli G,Platt O S,Lebouef C,Janin A,Scarpa A,Olivieri O,Amato E,Corrocher R,Beuzard Y,De Franceschi L. Abnormal modulation of cell protective systems in response to



ischemic/reperfusion injury is important in the development of mouse sickle cell hepatopathy. *Haematologica*, 96: 24-32 (2011).

**24. Sabaa N, de Franceschi L, Bonnin P, Castier Y, Malpeli G, Debbabi H, Galaup A, Maier-Redelsperger M, Vandermeersch S, Scarpa A, Janin A, Levy B, Girot R, Beuzard Y, Leboeuf C, Henri A, Germain S, Dussaule J-C, Tharaux P-L.** Endothelin receptor antagonism prevents hypoxia-induced mortality and morbidity in a mouse model of sickle-cell disease. *J Clin Invest*, 118: 1924-33 (2008).

**25. Pialoux V, Mounier R, Ponsot E, Rock E, Mazur A, Dufour S, Richard R, Richalet J P, Coudert J, Fellmann N.** Effects of exercise and training in hypoxia on antioxidant/pro-oxidant balance. *Eur J Clin Nutr*, 60: 1345-54 (2006).

**26. Paglia D E, Valentine W N.** Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.*, 70: 158-69 (1967).

**27. Johansson L H, Borg L A.** A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem*, 174: 331-6 (1988).

**28. Wu C, Wang P, Rao J, Wang Z, Zhang C, Lu L, Zhang F.** Triptolide alleviates hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating oxidative stress and inhibiting NF-kappaB activity in mice. *J Surg Res*, 166: e205-13 (2011).

**29. Osarogiagbon U R, Choong S, Belcher J D, Vercellotti G M, Paller M S, Hebbel R P.** Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. *Blood*, 96: 314-20 (2000).

**30. Kaul D K, Hebbel R P.** Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest*, 106: 411-20 (2000).

**31. Yusuf-Makagiansar H, Anderson M E, Yakovleva T V, Murray J S, Siahaan T J.** Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev*, 22: 146-67 (2002).

**32. Brittain J E, Parise L V.** The alpha4beta1 integrin in sickle cell disease. *Transfus Clin Biol*, 15: 19-22 (2008).

**33. Kaul D K, Finnegan E, Barabino G A.** Sickle red cell-endothelium interactions. *Microcirculation*, 16: 97-111 (2009).

**34. Kalambur V S, Mahaseth H, Bischof J C, Kielbik M C, Welch T E, Vilbäck A, Swanlund D J, Hebbel R P, Belcher J D, Vercellotti G M.** Microvascular blood flow and stasis in transgenic sickle mice: utility of a dorsal skin fold chamber for intravital microscopy. *Am J Hematol*, 77: 117-25 (2004).

**35. Wood K C, Hebbel R P, Granger D N.** Endothelial cell P-selectin mediates a proinflammatory and prothrombotic phenotype in cerebral venules of sickle cell transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286: H1608-14 (2004).

**36. Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M.** Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *J Am Coll Cardiol*, 39: 1229-35 (2002).

**37. Hines I N, Grisham M B.** Divergent roles of superoxide and nitric oxide in liver ischemia and reperfusion injury. *J Clin Biochem Nutr*, 48: 50-6 (2011).

**38. Steensberg A, Fischer C P, Keller C, Moller K, Pedersen B K.** IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285: E433-7 (2003).

**39. Solovey A, Kollander R, Shet A, Milbauer L C, Choong S, Panoskaltis-Mortari A, Blazar B R, Kelm R J, Hebbel R P.** Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin. *Blood*, 104: 840-6 (2004).

**40. Kollander R, Solovey A, Milbauer L C, Abdulla F, Kelm R J, Jr., Hebbel R P.** Nuclear factor-kappa B (NFkappaB) component p50 in blood mononuclear cells regulates endothelial tissue factor expression in sickle transgenic mice: implications for the coagulopathy of sickle cell disease. *Transl Res*, 155: 170-7 (2010).

**41. Thorin E, Webb D J.** Endothelium-derived endothelin-1. *Pflugers Arch*, 459: 951-8 (2010).

**42. Kaul D K, Zhang X, Dasgupta T, Fabry M E.** Arginine therapy of transgenic-knockout sickle mice improves microvascular function by reducing non-nitric oxide vasodilators, hemolysis, and oxidative stress. *Am J Physiol heart Circ Physiol*, 295: H39-47 (2008).



- 43. Dasgupta T, Hebbel R P, Kaul D K.** Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. *Free Radic Biol Med*, 41: 1771-80 (2006).
- 44. Ergul S, Brunson C Y, Hutchinson J, Tawfik A, Kutlar A, Webb R C, Ergul A.** Vasoactive factors in sickle cell disease: in vitro evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction. *Am J Hematol*, 76: 245-51 (2004).
- 45. Graido-Gonzalez E, Doherty J C, Bergreen E W, Organ G, Telfer M, McMillen M A.** Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. *Blood*, 92: 2551-5 (1998).

	Hematocrit (%)	RBCs ( $10^6/\mu\text{l}$ )	MCV (fl)	Reticulocytes (%)	Sickled cells (%)	WBC ( $10^3/\mu\text{l}$ )	Platelets ( $10^3/\mu\text{l}$ )
<i>C57n</i>	43.9 ± 1.3	9.6 ± 0.3	45.7 ± 0.3	2.5 ± 0.1	-	1.0 ± 0.1	676 ± 41
<i>C57-2h</i>	39.1 ± 2.1 a	8.6 ± 0.4	45.2 ± 0.3 §	2.5 ± 0.2	-	1.3 ± 0.2	637 ± 29
<i>C57-6h</i>	41.0 ± 1.3	9.2 ± 0.2	44.7 ± 0.4 §	3.2 ± 0.1 §#	-	1.5 ± 0.4	930 ± 53 §#
<i>SADn</i>	38.4 ± 0.9 *	8.7 ± 0.2 *	44.1 ± 0.4 c	5.2 ± 0.4 *	4.3 ± 0.9	7.6 ± 0.8 *	1 173 ± 66 *
<i>SAD-2h</i>	38.2 ± 1.0 *	8.6 ± 0.2 *	44.5 ± 0.4 *	5.1 ± 0.4 *	9.4 ± 4.0	3.2 ± 0.6 *§	1 136 ± 84 *
<i>SAD-6h</i>	34.5 ± 2.0 *b	8.1 ± 0.6 *	42.7 ± 0.6 *#d	3.7 ± 0.4 *§e	14.5 ± 2.4 §	5.8 ± 1.7 *	1 073 ± 126 *

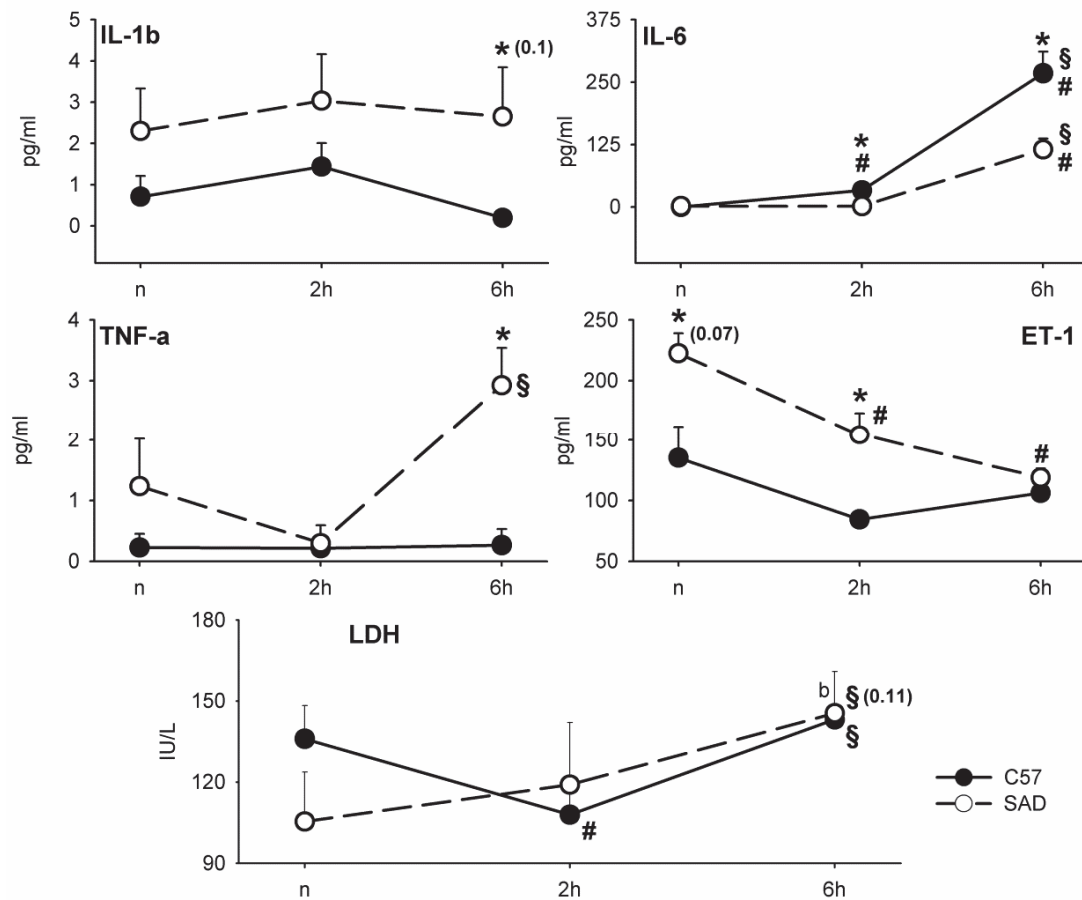
**Table 1: Hematologic parameters under normoxia (C57n; SADn) and under hypoxia followed by 2h or 6h reoxygenation in C57Bl/6 (C57-2h; C57-6h) and SAD mice (SAD-2h; SAD-6h).** \*: p<0.05 vs. C57n ; §: p<0.05 vs. normoxic group of the same species; #: p<0.05 vs. 2h of the same species; a: p=0.078 vs. C57n; b: p=0.11 vs. SADn and SAD-2h; c: p=0.063 vs. C57n; d: p=0.13 vs. SADn; e: p=0.063 vs. SAD-2h. Values are means ± SE.

	MDA	GPx	Catalase
<i>C57n</i>	19.64 ± 0.83	0.100 ± 0.004	26.22 ± 5.43
<i>SADn</i>	17.93 ± 1.29	0.134 ± 0.007 *	35.09 ± 2.55

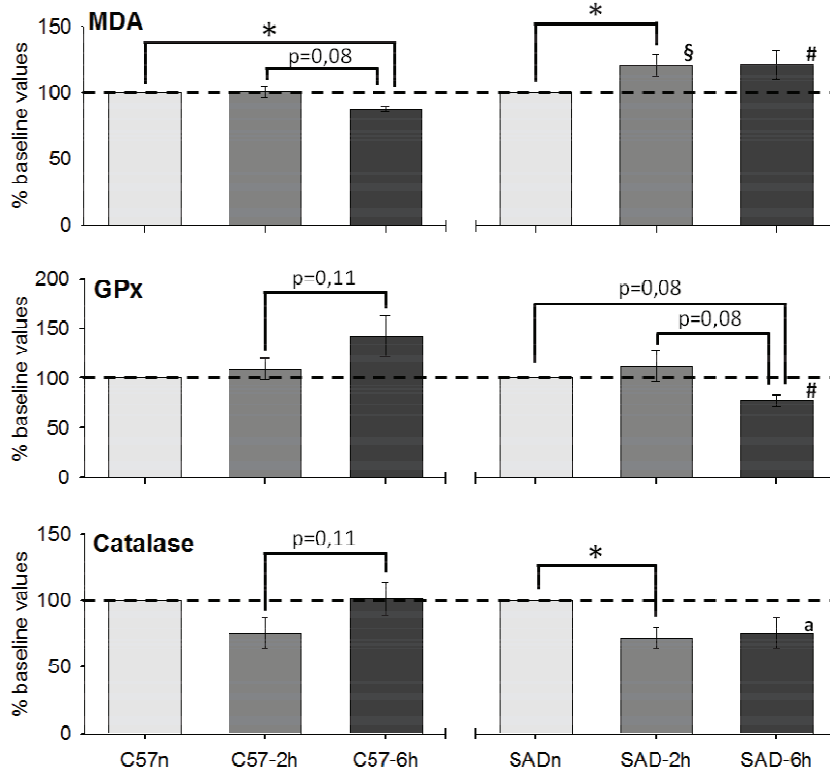
**Table 2: Normoxia oxidative stress values and antioxidant activities in C57Bl/6 and SAD mice (C57n; SADn).** MDA concentrations are expressed in  $\mu\text{mol/L/mg}$  protein; GPx and Catalase activities are expressed in  $\mu\text{mol/mL/min/mg}$  protein. \*: p<0.05 vs. C57n. Values are means ± SE.

	IL1- $\beta$ mRNA	TF mRNA	eNOS mRNA	ET-1 mRNA
<i>C57n</i>	93 ± 13	160 ± 18	33 ± 5	260 ± 32
<i>C57-2h</i>	629 ± 120 §	298 ± 37 §	49 ± 6 §	218 ± 22
<i>C57-6h</i>	573 ± 136 §	217 ± 27	35 ± 4	449 ± 62 §#
<i>SADn</i>	69 ± 25	113 ± 68	22 ± 12	304 ± 149
<i>SAD-2h</i>	1 489 ± 454 §	30 378 ± 4 811 §	1 855 ± 292 §	16 233 ± 2 410 §
<i>SAD-6h</i>	414 ± 139 §#	4 304 ± 2 599 §#	205 ± 94 §#	3 515 ± 2 033 §#

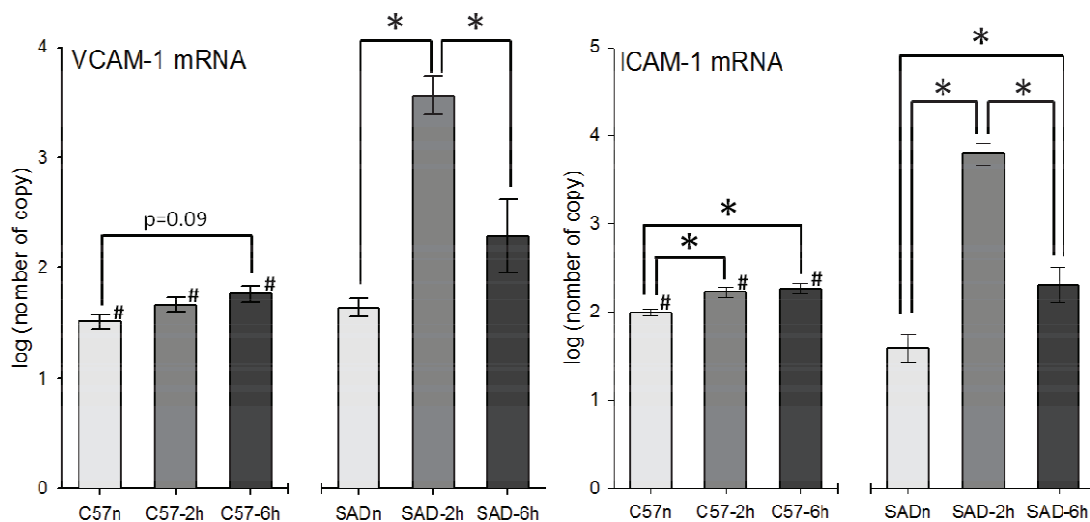
**Table 3: mRNA expression under normoxia (C57n; SADn) and hypoxia followed by 2h or 6h reoxygenation in C57Bl/6 (C57-2h; C57-6h) and SAD mice (SAD-2h; SAD-6h) in the lung.** §: p<0.05 vs. normoxic conditions in the same species; #: p<0.05 vs. 2h of the same species. Values are means ± SE.



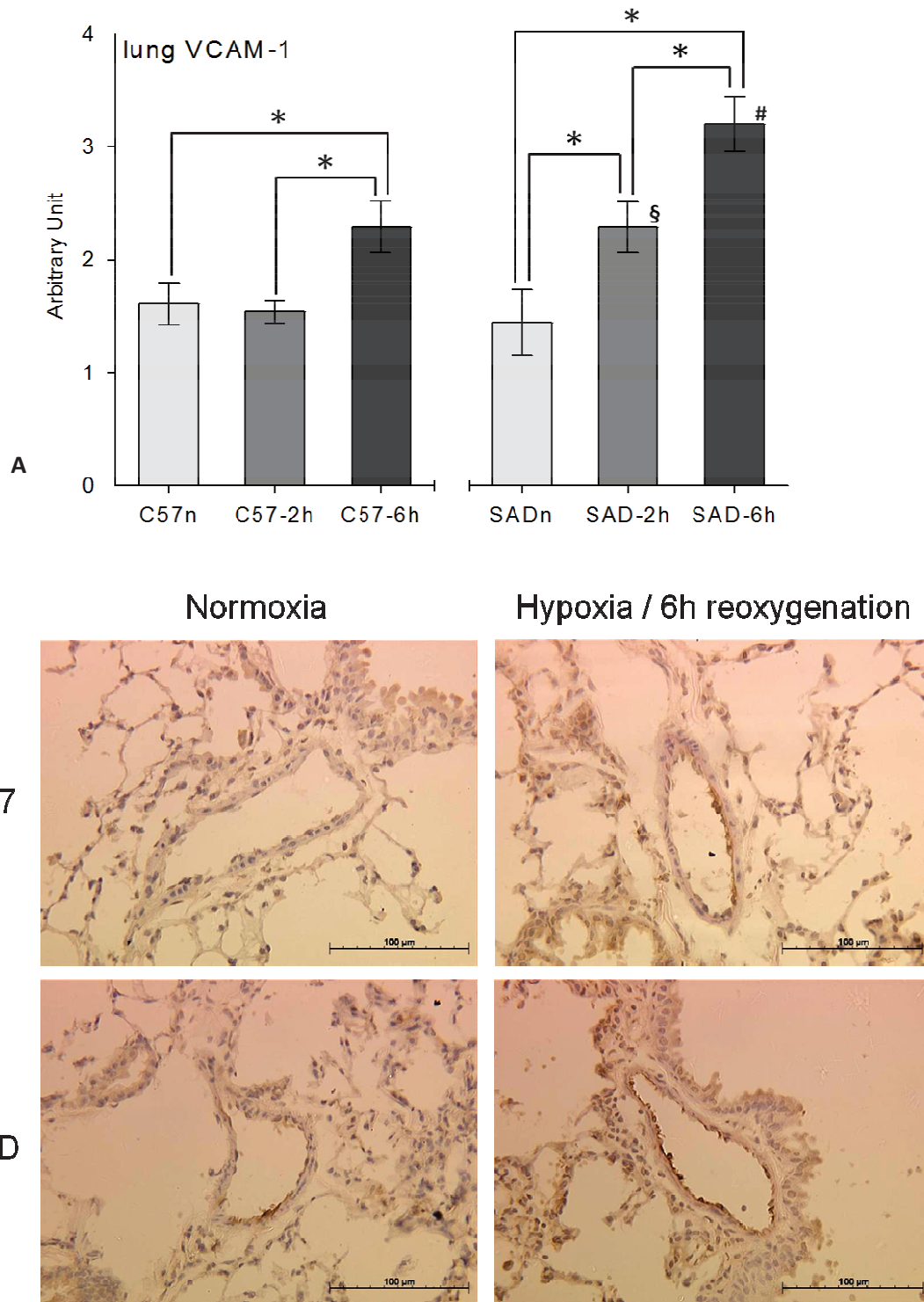
**Figure 1: Effect of H/R stress on plasma kinetic of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , ET-1 and LDH concentrations respectively under normoxia (C57n; SADn) and under hypoxia followed by 2h or 6h reoxygenation in C57Bl/6 (C57-2h; C57-6h) and SAD mice (SAD-2h; SAD-6h). Results are obtained in the C57-6h (dark circle) and SAD-6h (white circle). \*:  $p < 0.05$  between C57 and SAD mice for the same sampling time; #:  $p < 0.05$  in the same strain compared to normoxic condition; §:  $p < 0.05$  in the same strain compared to 2h condition (“p” values for tendency are reported in parentheses). Values are means  $\pm$  SE.**



**Figure 2: Oxidative stress under normoxia (C57n; SADn) and under hypoxia followed by 2h or 6h reoxygenation in C57Bl/6 (C57-2h; C57-6h) and SAD mice (SAD-2h; SAD-6h).** MDA : Malondialdehyde acid, GPx: Glutathione peroxidase activity. \*:  $p < 0.05$ ; § :  $p < 0.05$  versus C57-2h; #:  $p < 0.05$  versus C57-6h; a:  $p = 0.08$  versus C57-6h. Values are means  $\pm$  SE.



**Figure 3: Lung VCAM-1 and ICAM-1 transcripts expression under normoxia (C57n; SADn) and under hypoxia followed by 2h or 6h reoxygenation in C57Bl/6 (C57-2h; C57-6h) and SAD mice (SAD-2h; SAD-6h).** \*:  $p < 0.05$ ; a:  $p < 0.05$  compared to SAD-2h. Values are means  $\pm$  SE.



**Figure 4: VCAM-1 immunostaining on the lung endothelial surface.** A) Immunohistological slides were semi-quantified for VCAM-1 thanks to the staining intensity and a score describe in the material and methods. \*:  $p < 0.05$ ; §:  $p < 0.05$  versus C57-2h; #:  $p < 0.05$  versus C57-6h. Values are means  $\pm$  SE. B) Staining for VCAM-1 in the blood vessel of lung in the C57Bl/6 and SAD mice before H/R stress and after 6h of reoxygenation. Magnification X270.

**Etude n°4 : L'activité physique volontaire en roue d'activité prévient l'activation endothéliale et le stress oxydatif en réponse au stress d'hypoxie/réoxygénation chez les souris drépanocytaires SAD**

---

E.Aufradet, G.DeSouza, V.Pialoux, A.Bessaad, V.Bourgeois, EN.Chirico, L.Bezin, A. Francina et C.Martin.

A soumettre dans *Haematologica* en 2012.

---

Le but de cette étude était de déterminer les effets de l'activité physique chez les souris drépanocytaires en réponse à un stress d'hypoxie/réoxygénation. Pour cela, des souris contrôles C57Bl/6 et SAD ont effectué 8 semaines de roue d'activité physique volontaire avant d'être soumises à un stress d'H/R de 4h à 6,5% d'O<sub>2</sub> suivi de 2 ou 6h de réoxygénation. L'analyse de certains paramètres observés dans l'étude n°3 a permis de montrer que l'activité physique régulière permet de réduire l'expression endothéliale de VCAM-1 et le stress oxydatif en réponse à un stress d'H/R chez les SAD. L'augmentation de l'activité antioxydante de la GPx observée chez les souris SAD entraînées au repos pourrait expliquer cette baisse du stress oxydatif. De plus, nos résultats montrent une absence de variation de la LDH chez les souris SAD ayant participé à l'activité physique régulière, contrairement aux souris « inactives » qui semblent présenter une hémolyse accrue en réponse au stress d'H/R. Cette moindre hémolyse chez les souris SAD « actives » pourrait contribuer à réduire le stress-oxydatif. Ainsi, alors que le stress d'H/R induit, chez les souris SAD contrôles, des dysfonctionnements endothéliaux qui pourraient être responsable de désordres microcirculatoires menant aux CVO, les souris SAD ayant participé à l'activité physique régulière présentent une atténuation marquée de ces anomalies endothéliales. Elles sont caractérisées par une moindre activation endothéliale et un moindre stress oxydatif.

L'activité physique régulière pourrait ainsi être bénéfique chez les souris drépanocytaires SAD, en réduisant l'expression de facteurs impliqués dans les CVO. D'autres études doivent cependant être menées pour confirmer ces résultats par des observations plus directes de la CVO (analyses histologiques, microscopie intravitale) et sur des modèles murins plus sévères de la pathologie.

## Physical activity prevents endothelial activation and oxidative stress in sickle cell SAD mice

E.Aufradet<sup>1</sup>, G.DeSouza<sup>1</sup>, V.Pialoux<sup>1</sup>, A.Bessaad<sup>1</sup>, V.Bourgeaux<sup>2</sup>, EN. Chirico<sup>1,4</sup>, L.Bezin<sup>3</sup>, A. Francina<sup>5</sup>,  
and C.Martin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EA 647, Center of Research and Innovation on Sports, University of Lyon, Lyon, France; <sup>2</sup> ERYTECH Pharma, Lyon, France; <sup>3</sup> Inserm, U1028 – CNRS, UMR 5292, Translational and Integrative Group in Epilepsy Research, University of Lyon, Lyon, France; <sup>4</sup> INSERM U1060, Laboratory CarMeN, University of Lyon, Lyon, France; <sup>5</sup> Unit of Hemoglobin Molecular Pathology, Edouard Herriot Hospital, Lyon, FRANCE.

**Abstract:** Sickle cell disease (SCD) is a genetic pathology which is characterized by painful vaso-occlusive crises (VOC) mainly triggered by hypoxia and subsequent accumulation of rigid red blood cells (RBCs) in the vascular bed. Inflammation, vascular adhesion, hemolysis and oxidative stress are among the major factors involved in RBCs trapping and can therefore accentuate the pathophysiological conditions leading to the VOC crisis by increasing local hypoxia. Since chronic physical activity is known to decrease these factors in healthy subjects and in inflammatory pathologies, it could be beneficial in SCD by decreasing factors involved in vascular occlusions. This study proposes to compare, in sickle SAD mice, the effect of 8 weeks of increased physical activity (PA) by voluntary wheel running compared to untrained (CON) on the response to an acute hypoxia/reoxygenation (H/R) stress inducing endothelial activation and oxidative stress. The main results of this study showed that after the H/R stress there was a positive effect of PA in SAD mice with a significant decrease in VCAM-1 immunostaining in lungs and in lipid and protein oxidations in the heart. This possible improvement of endothelial activation and oxidative stress may be caused by a better antioxidant activity at rest or by a limitation of hemolysis (plasma lactate dehydrogenase was found to be higher in SAD<sub>CON</sub> than SAD<sub>PA</sub>). This study thus suggests that physical activity could blunt some deleterious effects of H/R stress in SAD mice and be protective against VOC.

**Introduction:**

Sickle cell disease (SCD) is a genetic pathology characterized by a single mutation in hemoglobin (Hb) gene (1). During periods of deoxygenation (promoted by hypoxia, acidosis or dehydration), this abnormal Hb (HbS) leads to HbS-polymer formation and sickling of red blood cells (RBCs) (1). Vaso-occlusive crisis (VOC) is one of the most common detrimental complications of SCD. Vaso-occlusion results from many pathophysiological mechanisms including sickling of RBCs, hemolysis, inflammation, vascular adhesion, oxidative stress and impaired nitric oxide bioavailability (2). All these mechanisms interact together to trap blood cells. This accentuates the local blood flow decrease and subsequent hypoxia which in turn intensifies the symptoms of the disease throughout a vicious circle leading to painful crisis and eventually to stroke, acute chest syndrome or osteonecrosis (2-4).

Recently, some studies were interested in the role of acute and chronic physical activity in SCD (5-6). Indeed, chronic exercise or physical training can develop physiologic and molecular adaptations including anti-inflammatory effects (7-9), oxidative stress limitations via the increase of the enzymatic antioxidant activity (9-11) or vascular adhesion limitations (12-14) as observed in healthy subjects or in inflammatory pathologies. Taken together these results suggest that habitual physical activity could be beneficial for SCD subjects by limiting physiological factors involved in the VOC. To our knowledge, this hypothesis has not been tested in SCD. Only two studies have tested the effects of a physical rehabilitation in SCD patients hospitalized for VOC. They showed in small patients cohorts that regular physical exercise decreased the length of hospitalization, decreased pain and improved quality of life (15-16). Nevertheless, from a clinical view, physicians are reluctant to recommend physical activity in these patients because it can increase the risk of VOC via augmented dehydration and acidosis (6). In previous studies, we tested the effects of habitual physical activity in heterozygous carriers of HbS, namely sickle cell trait (SCT) carriers (17-19). These studies reported some beneficial effects of habitual physical training on the endothelial function of SCT carriers including reduction of plasma soluble vascular adhesion molecule (sVCAM-1) (17),



blunting of oxidative stress markers (lipid and protein oxidations) and increase of the antioxidant activity (18-19). Finally, these results strengthen the hypothesis that habitual activity could reduce endothelial activation and oxidative stress in SCD.

The aim of the present study was therefore to investigate the effects of habitual physical activity in SCD. For that purpose, 8 weeks of a voluntary wheel running protocol was conducted in sickle cell disease SAD mice. Before sacrificing the animals, a hypoxia/reoxygenation (H/R) stress was used to stimulate the pathophysiological parameters involved in VOC triggering and determine whether physical activity can modulate them.

### **Material and methods:**

*Animals:* Healthy (C57Bl/6J) and SAD male mice (13 weeks old) were used in this study. SAD colony express the human SAD hemoglobin transgene ( $\alpha_2^{\text{human}}\beta_2^{\text{SAD}}$ ) containing three sickle mutations: D-punjab ( $\beta^{121}\text{Gln}$ ), Antilles ( $\beta^{23}\text{Ile}$ ) and  $\beta^S$  ( $\beta^6\text{Val}$ ) which confer  $\approx 19\%$  of HbSAD (20). This transgene aims to reproduce the hypoxia-induced vasoocclusive events of human SCD in SAD mice (21). C57Bl/6J mice (Charles River, L'Arbresle, France), which are the background of SAD mice, were used as control animal of the experimentation. The *Guide for the care and use of laboratory animals* provided by the Institute for Laboratory Animal Research (National Academy of Sciences, USA) were followed and all animal protocols were approved by the regional animal care committee (Rhône-Alpes, France).

*Experimental protocol:* Thirty two SAD mice and thirty seven C57Bl/6 (C57) mice were divided into 6 groups in each strain, as detailed in table 1. Mice were housed in standard mouse cages (CON) or in cages equipped with running wheels allowing increased physical activity (PA) during 8 weeks. After 8 weeks, mice were euthanized either after normoxic conditions (Nx) or after exposure to an acute 4h hypoxic stress at 6.5% oxygen followed by 2 hours (2h) or 6 hours (6h) of reoxygenation in ambient air. The oxygen level was regulated in a hermetic cage (Biospherix, USA) with an oxygen sensor system (Pro-ox, Biospherix, USA) using pure nitrogen gaz (Nitrogen 4.5, Linde Gaz s.a, St Priest, France).

*Physical activity:* During the 2 first weeks of the training, mice were housed at two per cage with (PA) or without running wheels (CON) to stimulate each other for running (22). After this period, mice were assigned to an individual cage for 6 weeks. All PA animals' cages were equipped with a 12.5 cm mouse metal-wheel (HAGEN-61700, Montreal, Canada). The number of completed revolutions was monitored by a magnetic switch affixed to each wheel and data were captured using a digital magnetic counter (model BC906; Sigma Sport, Neustadt, Germany). During the experimental period, total running distance and mice weight were recorded each week. Mice were maintained on a 12h light-dark cycle with food and water *ad libitum*.

*Tissue sampling:* After the end of the reoxygenation period, mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (50mg/Kg, Dolethal®, Vétquinol, Lure, France) and blood were collected by a retro-orbital venipuncture into heparinized tube for hematologic and plasma analysis. Mice were sacrificed by exsanguination with a 0.9% NaCl transcardial perfusion during 1min10. The soleus muscle (Sol), heart and lung were dissected. Then, cardiac left ventricle (LV) and soleus were weighted and immediately frozen in liquid nitrogen for respectively oxidative stress and enzymatic activity measurements. The lung was treated with a specific protocol (described below) for the immunohistologic analyses.

*Hematology:* Hematocrit (Htc), RBCs, white blood cells (WBCs) and platelets were measured in whole blood using an ABX automate (Horiba, Montpellier, France). The proportion of reticulocytes was assessed by flow cytometry using thiazole-orange staining (BD Retic reagent, BD Pharmingen, Oxford, UK). Plasma lactate dehydrogenase (LDH) was measured with commercial kit (QuantiChrom™ Lactate Dehydrogenase Kit, BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and the detection limit was 2 IU/L.

*Immunohistology:* Slides were prepared from the left lungs. Those tissues were pre-treated after dissection with a tracheal injection of 1/3 cryomatrix (thermoFisher scientific, Waltham, MA, USA) diluted in PBS 1X (VWR, West Chester, PA, USA). Afterward, lung were fixed in a 4%

paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in a 0.1M phosphate buffer solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) during 2h, then incubated 24h in 25% sucrose (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for cryoprotection and finally rapidly frozen in  $-40^{\circ}\text{C}$  isopentane (VWR, West Chester, PA, USA) before being stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . VCAM-1 immunostaining was performed on  $7\mu\text{m}$  frozen sections of left lung using a Rat monoclonal anti-mouse VCAM-1 antibody diluted at 1:40 (MCA2297GA, serotec AbD, Kidlington, UK). After washes, the sections were then incubated with a biotinilated Donkey anti-Rat antibody (712-485-153, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) diluted at 1:500. The revelation was performed with the avidin-biotin enzyme complex (Vectastain Elite ABC standard peroxidase Kit, Vector Lab, Burlingame, CA, USA) and his substrate 3,3'-diaminobenzidine (DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Lab, Burlingame, CA, USA). Expression of VCAM-1 was semi-quantified by estimation of percentage of blood vessels immunostained from one slide: for each vessel, a score from 1 to 4 was attributed (1: no VCAM-1 immunostaining, 2: less of 25% VCAM-1 staining, 3: less of 50% of VCAM-1 staining, 4: more than 50% of VCAM-1 staining). For each mouse, the VCAM-1 score was the mean of each vessel score from a slide. Analysis was blindly performed by two investigators under a light microscope (Leitz DIAPLAN Microscope, Leica, Wetzlar, Germany), and images were captured with a video camera 3CCD (DXC-930P, Sony, Tokyo, Japan) coupled to an image analysis system (Visilog<sup>®</sup> 6.3, Noesis).

*Oxidative stress:* The LV was homogenized (10%, w/v) in PBS 1X + EDTA 0.5mM in ice. A first centrifugation at 1,500g for 4 min at  $4^{\circ}\text{C}$  permitted to collect the supernatants for malondialdehyde acid (MDA) and protein measurements. A second centrifugation was performed at 12,000g for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and the resulting supernatants were used for the other measurements. Homogenate aliquots were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Protein concentrations in LV were determined using the BCA protein assays Kit (Novagen, Darmstadt, Germany) in accordance to the manufacturer's instructions. All the products used for oxidative stress measurements come from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA) and spectrophotometric measurements were performed on TECAN Infinite 2000 plate reader (Männedorf, Switzerland). Results were standardized per mg of total protein.

Concentrations of MDA were determined as thiobarbituric-reactive substances as previously described (23). The pink chromogen was extracted with n-butanol and MDA concentration was calculated using 1,1,3,3-tetraethoxypropane as standard.

Advanced oxidation protein products (AOPP) were determined using the semi-automated method described by Witko-Sarsat et al. (24). Briefly, AOPP reaction with acetic acid were measured by spectrophotometry on microplate reader and were calibrated with chloramine-T solutions that in a presence of potassium iodide absorb at 340 nm and were expressed as micromoles per liter of chloramine-T equivalents.

Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined by the modified method of Paglia and Valentine (25) with hydrogen peroxidase as substrate. It reflects the rate of NADPH to NADP<sup>+</sup> oxidation after addition of glutathione reductase, reduced glutathione and NADPH.

Catalase activity was determined as previously described (26), using hydrogen peroxide as a substrate and formaldehyde as a standard: activity was determined by the reaction of methanol and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using catalase as enzyme which lead to formaldehyde formation.

Superoxide dismutase (SOD) activity was determined using the Oberley and Spitz method (27) and reflects the degree of inhibition of the reaction between superoxide radicals, produced by a hypoxanthine - xanthine oxydase system, and nitroblue tetrazolium.

*Mitochondrial oxidative activity in soleus:* The two soleus muscles were cut into thin pieces and homogenized on ice at 10% with a mannitol buffer. Homogenates were then centrifuged for 20 min at 2500g (4°C). Supernatants were frozen at -80°C. Protein concentrations were determined spectrophotometrically using a BCA kit (Novagen, Darmstadt, Germany). Cytochrome c oxidase (COX) activity was determined using spectrophotometric observation (at 550 nm) of the cytochrome c (C-7752, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) oxidation kinetics, as previously described (28).

*Statistics:* All statistical analyses were performed using STATISTICA (Tulsa, OK, USA). All variables were tested for normality and variance homogeneity. GPx and catalase activities, MDA and AOPP contents, relative heart and left ventricle weights and reticulocyte counts were compared with non-parametric tests (Mann-Whitney). The other variables were compared using factorial ANOVA followed by Fischer post-hoc test. A p inferior to 0.05 was considered statistically significant and the data were expressed as means  $\pm$  SE.

### **Results:**

*Voluntary wheel running.* Independently of wheel running, SAD mice were characterized by higher heart weight/body weight (HW/BW) and left ventricle weight/body weight (LVW/BW) ratio and lower total body weight compared to C57 mice (Table 2). No significant difference in running distance was observed between C57<sub>PA</sub> and SAD<sub>PA</sub> mice. In both strains, physical activity was associated with a significant increase in HW/BW and LVW/BW and a significant decrease of the body weight compared to CON groups. In the soleus muscle, COX activity did not differ between CON and PA C57 mice. In SAD mice, soleus COX activity was significantly higher in control conditions than in C57 mice. After the wheel running training, this activity tended to decrease for SAD mice ( $p=0.08$ , SAD<sub>CON</sub> vs SAD<sub>PA</sub>) (Table 3).

*Hematological characteristics.* Compared to C57 mice, SAD mice exhibited higher reticulocytes, WBCs and platelets concentrations and lower hematocrit and RBCs values (Table 3). The responses to H/R stress were different in SAD mice concerning RBCs and reticulocytes: while increased reticulocyte count and no RBCs concentration variation were observed after 6h of reoxygenation in C57 mice, these values significantly decreased in the same condition in SAD mice. In both C57 and SAD mice 6h of reoxygenation also induced a significant decrease of hematocrit compared to 2h of reoxygenation or normoxia condition. In all conditions, no effect of physical activity was observed for all studied parameters (Table 3). However, LDH concentrations were significantly affected by physical activity in SAD mice only (Figure 1): LDH was significantly increased after H/R stress in the SAD<sub>CON</sub> group (versus

SAD<sub>CON</sub>Nx: +55% for SAD<sub>CON</sub>2H and +109% for SAD<sub>CON</sub>6H;  $p < 0.05$ ) whereas no significant variation was observed in the SAD<sub>PA</sub> group. Moreover, LDH concentration in SAD<sub>PA</sub>6H was significantly lower than in SAD<sub>CON</sub>6H (Figure 1).

*VCAM-1 lung immunostaining.* No significant difference in VCAM-1 immunostaining was observed between C57 and SAD, CON or PA mice in normoxic conditions (Figure 2). Whereas VCAM-1 staining did not differ between CON and PA after H/R stress in C57 mice, it was significantly increased only in sedentary SAD mice in response to hypoxia followed by 2h of reoxygenation (versus Nx). Moreover, SAD<sub>PA</sub> presented a significant lower VCAM-1 staining after 2h of reoxygenation compared to SAD<sub>CON</sub> (-18%;  $p < 0.05$ ). After 6h of reoxygenation, VCAM-1 expression was reduced in all the groups compared to normoxia and 2h of reoxygenation conditions (Figure 2).

*Oxidative stress in the heart.* As shown in table 4, MDA content in normoxic conditions was higher in PA mice compared to CON mice without genotype effect while AOPP concentrations did not significantly differ between control C57 and SAD mice. Moreover AOPP concentrations were higher in C57<sub>PA</sub> compared to C57<sub>CON</sub> ( $p < 0.05$ ) (Table 4). In response to H/R stress MDA significantly increased in control SAD mice (+25%;  $p < 0.05$  at 6H), whereas it decreased in PA SAD mice and in C57 (PA and CON) (Figure 3). Similarly, whereas AOPP either did not change (2H) or increased (6H) in SAD<sub>CON</sub>, it decreased in SAD<sub>PA</sub> mice. Finally, variations of MDA and AOPP contents were significantly different and lower in the SAD<sub>PA</sub> group compared to the SAD<sub>CON</sub> group (Figure 3).

*Enzymatic antioxidant activities.* Figure 4a shows that baseline GPX activity was significantly higher in the SAD<sub>PA</sub> group compared to their control counterparts (+96%;  $p < 0.05$ ). After the H/R stress (Figure 4b), whereas GPx activities did not change in C57 mice, these activities significantly increased in SAD<sub>CON</sub> and decreased in SAD<sub>PA</sub> (SAD<sub>CON</sub>2H-6H vs. SAD<sub>PA</sub>2H-6H: -50%;  $p < 0.05$ ). Catalase and SOD activities are presented in Table 5. SAD<sub>PA</sub>2H tended to express a lower catalase activity than SAD<sub>CON</sub>2H (-16%;  $p = 0.07$ ). It was also observed that catalase activity decreased after 6h of reoxygenation compared to 2h and/or Nx in all the groups except in SAD<sub>PA</sub> mice. SOD activities did

not statistically differ in the SAD mice groups with respect to PA or oxygen conditions. In C57 mice, SOD activity was significantly increased after 2h of reoxygenation compared to Nx and 6H in PA mice only ( $p < 0.05$ ).

### **Discussion:**

The aim of this study was to determine the impact of habitual physical activity on the endothelial activation and oxidative stress response to a vaso-occlusive H/R stress in a mouse model of SCD. This SAD mice model was chosen because they develop significant VOC in response to H/R stress due to their  $\beta^{\text{SAD}}$  transgene (21). Moreover, the exercise protocol was very well tolerated, and no adverse event was noted in PA or CON SAD mice.

The main result of this study was, in response to H/R stress, a reduction of endothelial VCAM-1 lung expression concomitantly with a limitation of oxidative stress and an increased baseline antioxidant activity in the heart in the SAD mice who experienced voluntary wheel running. Decreased LDH concentrations were also evident in mice undergoing PA. Voluntary wheel running has been chosen because it is a valid training method in mice which promote physical activity adaptations without any additional stress compared to forced treadmill running (29). Weekly report of the distance performed by mice confirm that physical activity was similar in both mice strains (mean of 26.5 Km/week), in accordance with mean distances covered by mice of the same genetic background (30-31). The increase in HW/BW and LVW/BW in PA groups are valid markers of the efficiency of physical activity in C57 as in SAD mice. Habitual physical activity has previously been associated with cardiac hypertrophy with an increase in cavity volumes, thickness and mass of the ventricle (22). Independent of the PA protocol, SAD mice presented a higher cardiac weight than C57 mice. These results confirm previous studies conducted on other mice models of SCD (32) or in SCD patients (33) that reported an increase in heart weight. The increase of blood volume as an adaptive response to chronic anemia causing may enlarge the heart volume (33).

Cytochrome c oxidase activity in soleus muscle was higher in SAD mice than in C57 mice. This result suggests an enhancement of the oxidative capacity of the respiratory chain and/or of the amount of functional mitochondria in SAD mice. As suggested by Sakkas et al., who showed that COX activity was increased in the more anemic dialysis patients, hypoxia exposure may improve the oxidant enzyme activities in order to counteract the reduction of oxygen supply (34). However, while no soleus COX activity difference was observed between C57 PA and CON mice, COX activity tended to be lower in SAD<sub>PA</sub> than in SAD<sub>CON</sub> ( $p=0.08$ ). This result is puzzling as oxidative enzymes usually increase with physical activity (28,35), including after running wheel programs in mice (22). One may hypothesize that the decreased COX activity observed in the present study could be due to a reduction in hemolysis-induced anemia, resulting in reduced peripheral hypoxia. However RBCs and Ht were not affected by PA in SAD mice. Thereby, other enzymatic analysis and more qualitative assays of oxygen transport capacity (as Hb and Hb mass) should be performed on sickle cell mice or SCD subjects in order to confirm and explain these surprising COX activity results.

In control SAD mice, H/R stress was associated with an increase in VCAM-1 lung expression and increased lipid and protein oxidations in the heart. These results suggest that HbS mutation is likely involved in the increased endothelial activation and oxidative stress, as these phenomena were not observed in C57 mice. These results are in agreement with previous studies which reported increased oxidative stress and cell adhesion after H/R stress in other sickle mice models (36-38).

However, our study shows that physical activity blunted these pathophysiological responses to H/R stress. On the contrary to control SAD mice, VCAM-1 expression was not increased by H/R stress in the PA group, suggesting that PA protocol can limit endothelial activation in the lungs. These results confirm previous studies performed on cardiac pathologies (12-13) and SCT carriers (17) where plasma sVCAM-1 expression was decrease after a training session. Endothelial activation has been shown to be mediated by inflammation, ROS, hemolysis and decreased NO bioavailability, mainly via the NF $\kappa$ B pathway (38-39). The effects of PA on lung inflammation and oxidative stress in



these mice model should be measured in future studies. VCAM-1 is known to bind leukocytes and immature reticulocytes via the VLA-4 receptor expressed on the cells surface (38,40). It may be speculated that a decreased cell adhesion on the vascular wall after PA may limit vascular occlusions risks. However, a study performed on SAD mice show that before or after a hypoxic stress, expression of VLA-4 on immature reticulocytes was undetectable (41). Consequently, measurement of VLA-4 expression in responses to physical training in leucocytes of SAD mice or in reticulocytes in other SCD models may bring new information regarding the modulatory effects of PA on the physiological pathway of vascular adhesion

In the heart, oxidative stress in response to H/R stress was increased compared to baseline values in control SAD<sub>CON</sub> mice, while it was reduced or unchanged in SAD<sub>PA</sub> mice as well as C57 mice. This suggests that physical activity could likely abolish the oxidative stress increase observed in this SCD model. Oxidative stress results from the balance between ROS production and antioxidant defenses. The higher baseline GPx activity in physically active SAD mice compared to SAD<sub>CON</sub> may explain this decreased oxidative stress as an improved antioxidant system can better neutralize ROS (42). However, as already observed in the literature (43-45), catalase and SOD were not affected by PA. This higher GPx activity could be explained by higher baseline MDA content in the PA group compared to control group. The higher level of resting MDA in PA mice could be related to the ability of oxidized lipids to activate antioxidant enzyme expression and to improve cellular tolerance against ROS attacks (46). It is therefore possible that the higher MDA in baseline may result in a physiological antioxidant adaptation to physical training (47-48), such as we saw for GPX, which is likely needed to maintain the oxidant/antioxidant homeostasis in response to acute exercise (48-49).

A decreased ROS production independent of the antioxidant status may also explain the blunted oxidative stress by PA. Although ROS production was not measured in this experiment, it has already been demonstrated that physical training in old, diabetic or smoking rat models (9-11) was associated with a decreased ROS generation. It may be therefore hypothesized that similar

adaptations occur in SAD mice. The decreased hemolysis observed by lower LDH in PA SAD mice after the vasoocclusive H/R stress compared to CON mice supports this hypothesis. In response to RBCs lysis, the arginase and cell-free hemoglobin released in the plasma (4,50) have been shown to be involved in ROS production in SCD via eNOS uncoupling (42,51). Cell-free hemoglobin is also responsible for iron release into the endothelial cell membrane where it induce endothelial activation along with cell adhesion molecule expression and ROS production (51). Consequently, if PA decreases hemolysis, less cell-free hemoglobin could have been released into plasma thus limiting ROS production. However, this hypothesis has to be tempered because no variations in hematocrit, RBCs and reticulocytes concentrations were observed in PA SAD mice. The lower GPx and catalase ( $p=0.07$ ) activity in response to H/R stress in PA mice, may also play a part in this reduced ROS production hypothesis in SAD mice. Indeed, a decreased ROS production during H/R stress in SAD<sub>PA</sub> likely understimulated the antioxidant enzymes release.

In conclusion, this study is the first to demonstrate the beneficial effects of habitual physical activity on the response to a vasoocclusive stress in SCD mice. Voluntary wheel running protocol has been well tolerated by the sickle SAD mice. More importantly, physical activity reduced H/R-induced endothelial activation in the lungs. Cardiac oxidative stress was likely reduced due to an improvement of the antioxidant GPx activity and of a reduction of hemolysis. As a consequence, physical activity in SAD mice may be an interesting way to reduce oxidative and endothelial complications related to vaso-occlusive crises as it was already shown in SCT subjects (17-18). Further studies performed on more severe SCD mice models and in SCD subjects will have to verify the efficiency and/or the benefits of PA in SCD.

**Acknowledge:** We thank Pr. Y. Beuzard (INSERM U733, Paris, France) for providing initial SAD breeding pairs which allowed our lab to develop SAD colony; Y. Champion, A. Dorier and E. Lemarie for technical assistance and the French Society of Hematology for financial support.

**Author contributions:** EA, VP, ECS and CM participated in the design of the study; EA, GDS, AB and VB conducted the experiments; EA and CM wrote the manuscript and LB, VP, ECS, ENC and AF revised the manuscript.

### Bibliography:

1. Rees D C, Williams T N, Gladwin M T. Sickle-cell disease. *Lancet*, 376: 2018-31 (2010).
2. Conran N, Costa F F. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clin Biochem*, 42: 1824-38 (2009).
3. Ballas S K. Defining the phenotypes of sickle cell disease. *Hemoglobin*, 35: 511-9 (2011).
4. Kato G J, Gladwin M T, Steinberg M H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*, 21: 37-47 (2007).
5. Balayssac-Siransy E, Connes P, Tuo N, Danho C, Diaw M, Sanogo I, Hardy-Dessources M-D, Samb A, Ballas S K, Bogui P. Mild haemorheological changes induced by a moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol*, 154: 398-407 (2011).
6. Connes P, Machado R F, Hue O, Reid H. Exercise limitation, exercise testing and exercise recommendations in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc*, 49: 151-63 (2011).
7. Balducci S, Zanuso S, Nicolucci A, Fernando F, Cavallo S, Cardelli P, Fallucca S, Alessi E, Letizia C, Jimenez A, Fallucca F, Pugliese G. Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 20: 608-17 (2010).
8. Adamopoulos S, Parissis J, Karatzas D, Kroupis C, Georgiadis M, Karavolias G, Paraskevaidis J, Koniavitou K, Coats A J S, Kremastinos D T. Physical training modulates proinflammatory cytokines and the soluble Fas/soluble Fas ligand system in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 39: 653-63 (2002).
9. Teixeira-Lemos E, Nunes S, Teixeira F, Reis F. Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Cardiovasc Diabetol*, 10: 12 (2011).
10. Menegali B T, Nesi R T, Souza P S, Silva L A, Silveira P C, Valenca S S, Pinho R A. The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. *Pulm Pharmacol Ther*, 22: 567-73 (2009).
11. Radak Z, Chung H Y, Naito H, Takahashi R, Jung K J, Kim H J, Goto S. Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. *FASEB J*, 18: 749-50 (2004).
12. Saetre T, Enoksen E, Lyberg T, Strandén E, Jørgensen J J, Sundhagen J O, Hisdal J. Supervised exercise training reduces plasma levels of the endothelial inflammatory markers e-selectin and icam-1 in patients with peripheral arterial disease. *Angiology*, 62: 301-5 (2011).
13. Adamopoulos S, Parissis J, Kroupis C, Georgiadis M, Karatzas D, Karavolias G, Koniavitou K, Coats A J, Kremastinos D T. Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J*, 22: 791-7 (2001).
14. Zoppini G, Targher G, Zamboni C, Venturi C, Cacciatori V, Moghetti P, Muggeo M. Effects of moderate-intensity exercise training on plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in older patients with type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 16: 543-9 (2006).
15. Tinti G, Somera R, Jr., Valente F M, Domingos C R B. Benefits of kinesiotherapy and aquatic rehabilitation on sickle cell anemia. A case report. *Genet Mol Res*, 9: 360-4 (2010).
16. Alcorn R, Bowser B, Henley E J, Holloway V. Fluidotherapy and exercise in the management of sickle cell anemia. A clinical report. *Phys Ther*, 64: 1520-2 (1984).
17. 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. Habitual Physical

- Activity and Endothelial Activation in Sickle Cell Trait Carriers. *Med Sci Sports Exerc*, 42: 1987-94 (2010).
18. Chirico E N, Martin C, Faes C, Feasson L, Oyono-Enguelle S, Aufradet E, Dubouchaud H, Francina A, Canet-Soulas E, Thiriet P, Messonnier L A, Pialoux V. Exercise training blunts oxidative stress in sickle cell trait carriers. *J Appl Physiol*, 112: 1445–53 (2012).
19. Faès C, Martin C, Chirico E N, Feasson L, Oyono-Enguelle S, Dubouchaud H, Francina A, Thiriet P, Pialoux V, Messonnier L. Effect of alpha-thalassemia on exercise-induced oxidative stress in sickle cell trait. *Acta Physiol*: [sous presse] (2012).
20. Trudel M, Saadane N, Garel M C, Bardakdjian-Michau J, Blouquit Y, Guerquin-Kern J L, Rouyer-Fessard P, Vidaud D, Pachnis A, Romeo P H, et al. Towards a transgenic mouse model of sickle cell disease: hemoglobin SAD. *EMBO J*, 10: 3157-65 (1991).
21. Trudel M, De Paepe M E, Chretien N, Saadane N, Jacmain J, Sorette M, Hoang T, Beuzard Y. Sickle cell disease of transgenic SAD mice. *Blood*, 84: 3189-97 (1994).
22. Aufradet E, Bessaad A, Alsaïd H, Schafer F, Sigovan M, De Souza G, Chirico E, Martin C, Canet-Soulas E. In vivo cardiac anatomical and functional effects of wheel running in mice by magnetic resonance imaging. *Exp Biol Med (Maywood)*, 237: 263-70 (2012).
23. Pialoux V, Mounier R, Ponsot E, Rock E, Mazur A, Dufour S, Richard R, Richalet J P, Coudert J, Fellmann N. Effects of exercise and training in hypoxia on antioxidant/pro-oxidant balance. *Eur J Clin Nutr*, 60: 1345-54 (2006).
24. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen A T, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*, 49: 1304-13 (1996).
25. Paglia D E, Valentine W N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.*, 70: 158-69 (1967).
26. Johansson L H, Borg L A. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem*, 174: 331-6 (1988).
27. Oberley L W, Spitz D R. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.*, 105: 457-64. (1984).
28. Duclos M, Martin C, Malgat M, Mazat J P, Chaoulouff F, Mormède P, Letellier T. Relationships between muscle mitochondrial metabolism and stress-induced corticosterone variations in rats. *Eur J Physiol*, 443: 218-26 (2001).
29. Moraska A, Deak T, Spencer R L, Roth D, Fleshner M. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 279: R1321-9 (2000).
30. Konhilas J P, Maass A H, Luckey S W, Stauffer B L, Olson E N, Leinwand L A. Sex modifies exercise and cardiac adaptation in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H2768-76 (2004).
31. Davidson S R, Burnett M, Hoffman-Goetz L. Training effects in mice after long-term voluntary exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 38: 250-5 (2006).
32. Mancini E A, Hillery C A, Bodian C A, Zhang Z G, Luty G A, Coller B S. Pathology of Berkeley sickle cell mice: similarities and differences with human sickle cell disease. *Blood*, 107: 1651-8 (2006).
33. Knight-Perry J E, de Las Fuentes L, Waggoner A D, Hoffmann R G, Blinder M A, Davila-Roman V G, Field J J. Abnormalities in cardiac structure and function in adults with sickle cell disease are not associated with pulmonary hypertension. *J Am Soc Echocardiogr.*, 24: 1285-90 (2011).
34. Sakkas G K, Ball D, Sargeant A J, Mercer T H, Koufaki P, Naish P F. Skeletal muscle morphology and capillarization of renal failure patients receiving different dialysis therapies. *Clin Sci*, 107: 617-23 (2004).
35. LeBlanc P J, Peters S J, Tunstall R J, Cameron-Smith D, Heigenhauser G J. Effects of aerobic training on pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase in human skeletal muscle. *J Physiol*, 557: 559-70 (2004).
36. Osarogiagbon U R, Choong S, Belcher J D, Vercellotti G M, Paller M S, Heibel R P. Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. *Blood*, 96: 314-20 (2000).

- 37. Kaul D K, Hebbel R P.** Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest*, 106: 411-20 (2000).
- 38. Kaul D K, Liu X-D, Choong S, Belcher J D, Vercellotti G M, Hebbel R P.** Anti-inflammatory therapy ameliorates leukocyte adhesion and microvascular flow abnormalities in transgenic sickle mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H293-301 (2004).
- 39. Aslan M, Freeman B A.** Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radic Biol Med*, 43: 1469-83 (2007).
- 40. Setty B N, Stuart M J.** Vascular cell adhesion molecule-1 is involved in mediating hypoxia-induced sickle red blood cell adherence to endothelium: potential role in sickle cell disease. *Blood*, 88: 2311-20 (1996).
- 41. Trinh-Trang-Tan M M, Vilela-Lamego C, Picot J, Wautier M P, Cartron J P.** Intercellular adhesion molecule-4 and CD36 are implicated in the abnormal adhesiveness of sickle cell SAD mouse erythrocytes to endothelium. *Haematologica*, 95: 730-7 (2010).
- 42. Chirico E N, Pialoux V.** Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life*, 64: 72-80 (2012).
- 43. Criswell D, Powers S, Dodd S, Lawler J, Edwards W, Renshler K, Grinton S.** High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med Sci Sports Exerc*, 25: 1135-40 (1993).
- 44. Powers S K, Criswell D, Lawler J, Ji L L, Martin D, Herb R A, Dudley G.** Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, 266: R375-80 (1994).
- 45. Higuchi M, Cartier L J, Chen M, Holloszy J O.** Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. *J Gerontol*, 40: 281-6 (1985).
- 46. Niki E.** Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med*, 47: 469-84 (2009).
- 47. Majerczak J, Rychlik B, Grzelak A, Grzmil P, Karasinski J, Pierzchalski P, Pulaski L, Bartosz G, Zoladz J A.** Effect of 5-week moderate intensity endurance training on the oxidative stress, muscle specific uncoupling protein (UCP3) and superoxide dismutase (SOD2) contents in vastus lateralis of young, healthy men. *J Physiol Pharmacol*, 61: 743-51 (2010).
- 48. Ji L L.** Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol*, 42: 582-93 (2007).
- 49. Zhou L Z, Johnson A P, Rando T A.** NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med*, 31: 1405-16 (2001).
- 50. Gladwin M T, Sachdev V.** Cardiovascular abnormalities in sickle cell disease. *J Am Coll Cardiol*, 59: 1123-233 (2012).
- 51. Nur E, Biemond B J, Otten H M, Brandjes D P, Schnog J J.** Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. *Am J Hematol*, 86: 484-9 (2011).

	<b>C57<sub>CON</sub></b>	<b>C57<sub>PA</sub></b>	<b>SAD<sub>CON</sub></b>	<b>SAD<sub>PA</sub></b>
Normoxia (Nx)	n=7	n=7	n=6	n=6
Hypoxia + 2h of reoxygenation (2h)	n=7	n=8	n=6	n=6
Hypoxia + 6h of reoxygenation (6h)	n=4	n=4	n=4	n=4

**Table 1. Mice distribution.**

	<b>HW/BW</b> (mg/g)	<b>LVW/BW</b> (mg/g)	<b>Body weight</b> (g)	<b>COX activity</b> (nmol /min/mg prot)	<b>Distance run</b> (km/week)
<i>C57<sub>CON</sub></i>	4,99 ± 0,11	3,98 ± 0,08	30,15 ± 0,40	0,373 ± 0,057 #	-
<i>C57<sub>PA</sub></i>	5,45 ± 0,10 *	4,29 ± 0,09 *	29,08 ± 0,51 a	0,394 ± 0,040 #	24,77 ± 3,18
<i>SAD<sub>CON</sub></i>	6,12 ± 0,20	4,70 ± 0,21	29,40 ± 0,43	0,692 ± 0,100	-
<i>SAD<sub>PA</sub></i>	7,05 ± 0,30 *	5,24 ± 0,22 *	27,68 ± 0,29 *	0,415 ± 0,076 b	28,49 ± 2,93
<i>C57 vs. SAD</i>	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	-
<i>CON vs. PA</i>	p<0.05	p<0.05	p<0.05	-	-

**Table 2. Characteristics of animals after physical activity protocol (PA) in wild type (C57) and SAD mice.** Values are means ± SE. CON: control mice; HW/BW: heart weight /body weight; LVW/BW: left ventricular weight /body weight; COX: cytochrome c oxidase. \*: p<0.05 vs. CON of the same group; #: p<0.05 vs. SAD<sub>CON</sub>; a: p=0.07 vs. C57<sub>CON</sub>; b: p=0.08 vs. SAD<sub>CON</sub>.

		Hematocrit (%)	RBCs ( $10^6/\mu\text{l}$ )	Reticulocytes (%)	WBCs ( $10^3/\mu\text{l}$ )	Platelets ( $10^3/\mu\text{l}$ )
<i>C57<sub>CON</sub></i>	<i>Nx</i>	45.9 ± 0.9 *	9.36 ± 0.28	2.30 ± 0.25 *	2.16 ± 0.45	813 ± 44
	<i>2H</i>	46.1 ± 0.7 *	9.94 ± 0.31	2.26 ± 0.27 *	0.96 ± 0.24 #	906 ± 13
	<i>6H</i>	41.0 ± 1.3	9.18 ± 0.24	3.15 ± 0.06	1.45 ± 0.38	930 ± 53
<i>C57<sub>PA</sub></i>	<i>Nx</i>	46.8 ± 1.2 *	9.65 ± 0.37	1.94 ± 0.32 *	2.08 ± 0.31	866 ± 40 *
	<i>2H</i>	43.9 ± 0.4 *	9.12 ± 0.10	2.30 ± 0.29 *	1.02 ± 0.17 #	761 ± 87 *
	<i>6H</i>	38.8 ± 2.4	8.54 ± 0.71	4.53 ± 1.08	1.30 ± 0.30	1 038 ± 99
<i>SAD<sub>CON</sub></i>	<i>Nx</i>	39.2 ± 1.0 *	8.72 ± 0.35	5.67 ± 1.18 a	5.16 ± 0.74	1 218 ± 107
	<i>2H</i>	40.2 ± 0.8 *	9.04 ± 0.23 *	5.61 ± 1.33	3.92 ± 0.86	1 370 ± 117
	<i>6H</i>	34.5 ± 2.0	8.10 ± 0.56	3.73 ± 0.39	5.75 ± 1.74	1 073 ± 126
<i>SAD<sub>PA</sub></i>	<i>Nx</i>	39.7 ± 0.9 *	9.20 ± 0.21 *	5.83 ± 0.97 *	4.68 ± 0.95	1 304 ± 107
	<i>2H</i>	38.0 ± 1.8	8.79 ± 0.28 *	4.99 ± 1.24	3.32 ± 0.34	1 528 ± 196
	<i>6H</i>	31.8 ± 1.6	7.39 ± 0.27	3.58 ± 0.13	4.10 ± 1.15	1 302 ± 52
<i>C57 vs. SAD</i>		p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05
<i>6H vs. Nx/2H</i>		p<0.05	p<0.05	-	-	-

**Table 3. Hematologic parameters in wild type (C57) and SAD mice exposed to a hypoxia/reoxygenation stress (2H or 6H) after a physical activity protocol (PA).** Values are means ± SE. CON: control mice; Nx: Normoxia condition; RBCs: red blood cells; WBCs: white blood cells. \*: p<0.05 vs. 6H of the same group; #: p<0.05 vs. normoxic of the same group; a: p=0.14 vs. SAD<sub>CON</sub>6H.

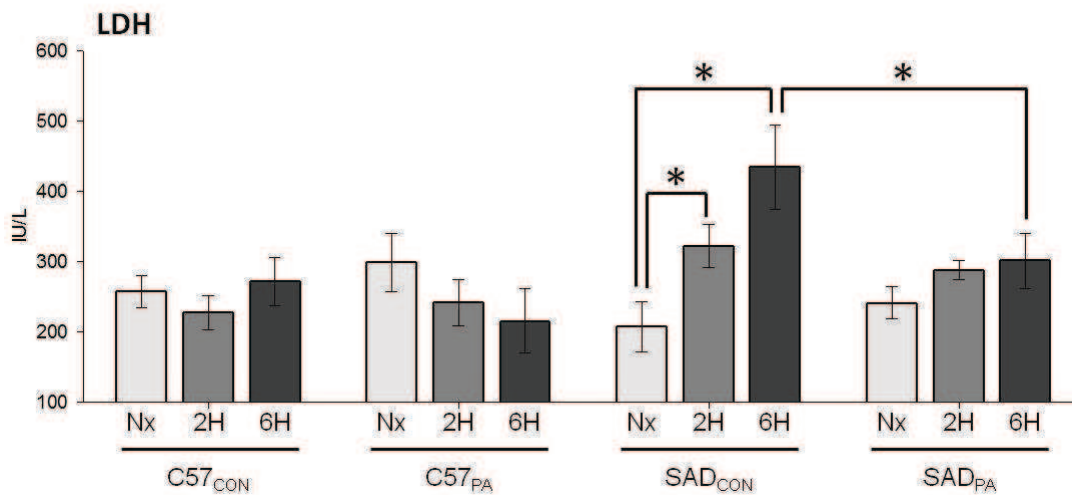
	MDA	AOPP
<i>C57<sub>CON</sub></i>	18,5 ± 1,4	9,2 ± 0,2
<i>C57<sub>PA</sub></i>	20,6 ± 1,3	11,1 ± 0,4 *
<i>SAD<sub>CON</sub></i>	17,0 ± 1,2	10,7 ± 0,8
<i>SAD<sub>PA</sub></i>	20,4 ± 1,1	10,7 ± 0,5
<i>CON vs. PA</i>	p<0.05	-

**Table 4. Malondialdehyde (MDA) and advanced oxidation protein products (AOPP) in normoxic conditions after a physical activity protocol (PA) in wild type (C57) and SAD mice in the heart left ventricle.** Values are means ± SE. CON: control mice. MDA is expressed in  $\mu\text{mol/L/mg}$  protein and AOPP in  $\mu\text{mol/L}$  of chloramines-T equivalents/mg protein. \*: p<0.05 vs. C57<sub>CON</sub>.



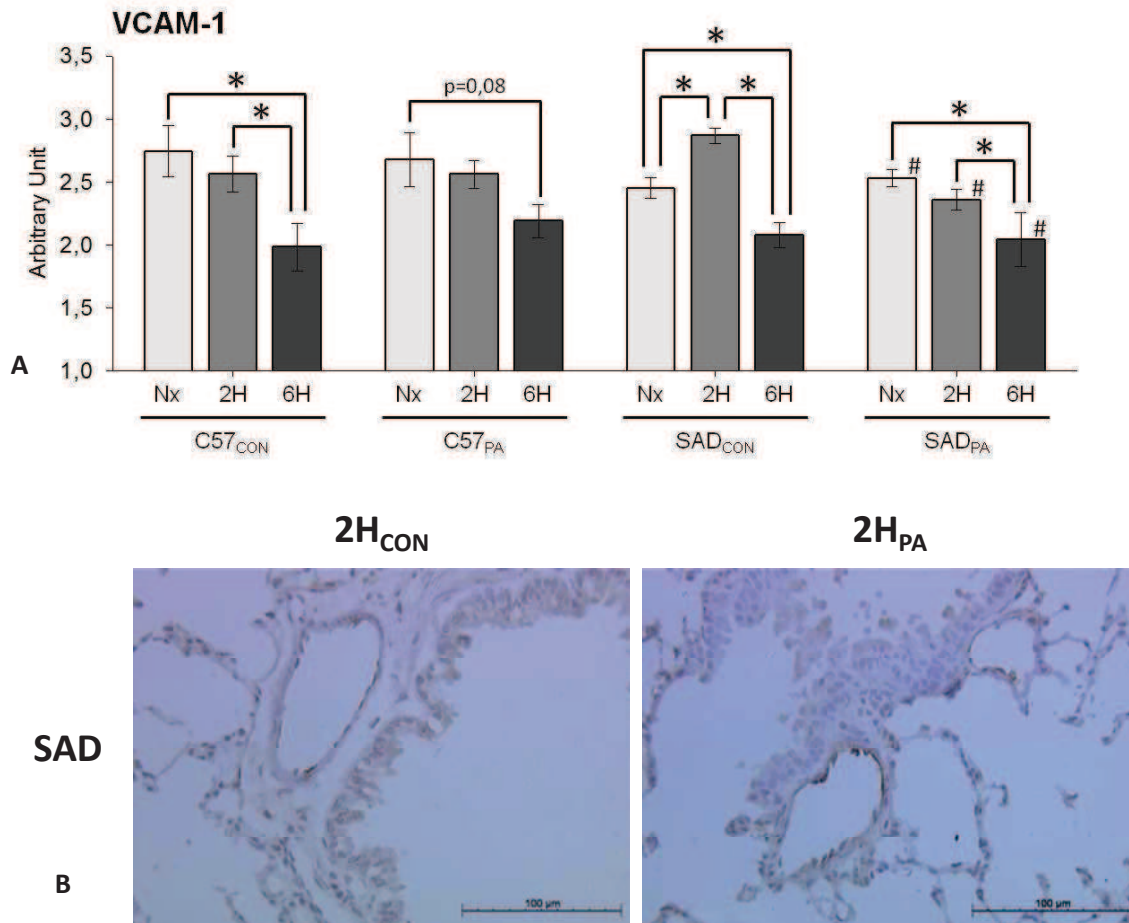
		Catalase	SOD
<i>C57<sub>CON</sub></i>	<i>Nx</i>	21,9 ± 1,2	27,1 ± 2,4
	<i>2H</i>	21,8 ± 1,1 a	27,1 ± 1,3
	<i>6H</i>	18,7 ± 1,4	23,3 ± 2,1
<i>C57<sub>PA</sub></i>	<i>Nx</i>	22,6 ± 2,1 b	27,0 ± 1,6 *
	<i>2H</i>	22,7 ± 1,7 #	34,3 ± 4,6
	<i>6H</i>	17,5 ± 1,8	25,4 ± 1,5 *
<i>SAD<sub>CON</sub></i>	<i>Nx</i>	24,6 ± 0,7 #	23,5 ± 2,3
	<i>2H</i>	25,7 ± 1,4 #	24,8 ± 1,6
	<i>6H</i>	19,4 ± 0,9	21,9 ± 1,6
<i>SAD<sub>PA</sub></i>	<i>Nx</i>	22,5 ± 1,3	25,2 ± 2,5
	<i>2H</i>	21,6 ± 1,4 §	25,6 ± 1,4
	<i>6H</i>	19,7 ± 0,7	23,3 ± 2,4
<i>C57 vs. SAD</i>		p=0.1	p<0.05

**Table 5. Antioxidant activity in wild type (C57) and SAD mice exposed to hypoxia/reoxygenation stress (2H or 6H) after a physical activity protocol (PA) in the heart left ventricle.** Values are means ± SE. CON: control mice; Nx: Normoxia condition; SOD: superoxyde dismutase. Catalase is expressed in  $\mu\text{mol/L}/\text{min}/\text{mg}$  protein and SOD in  $\text{nmol/L}/\text{min}/\text{mg}$  protein. #:  $p<0.05$  vs. 6H of the same group; §:  $p=0.07$  vs. *SAD<sub>CON</sub>2H*; \*:  $p<0.05$  vs. *C57<sub>PA</sub>2H*; a:  $p=0.08$  vs. *C57<sub>CON</sub>6H*; b:  $p=0.08$  vs. *C57<sub>PA</sub>6H*.

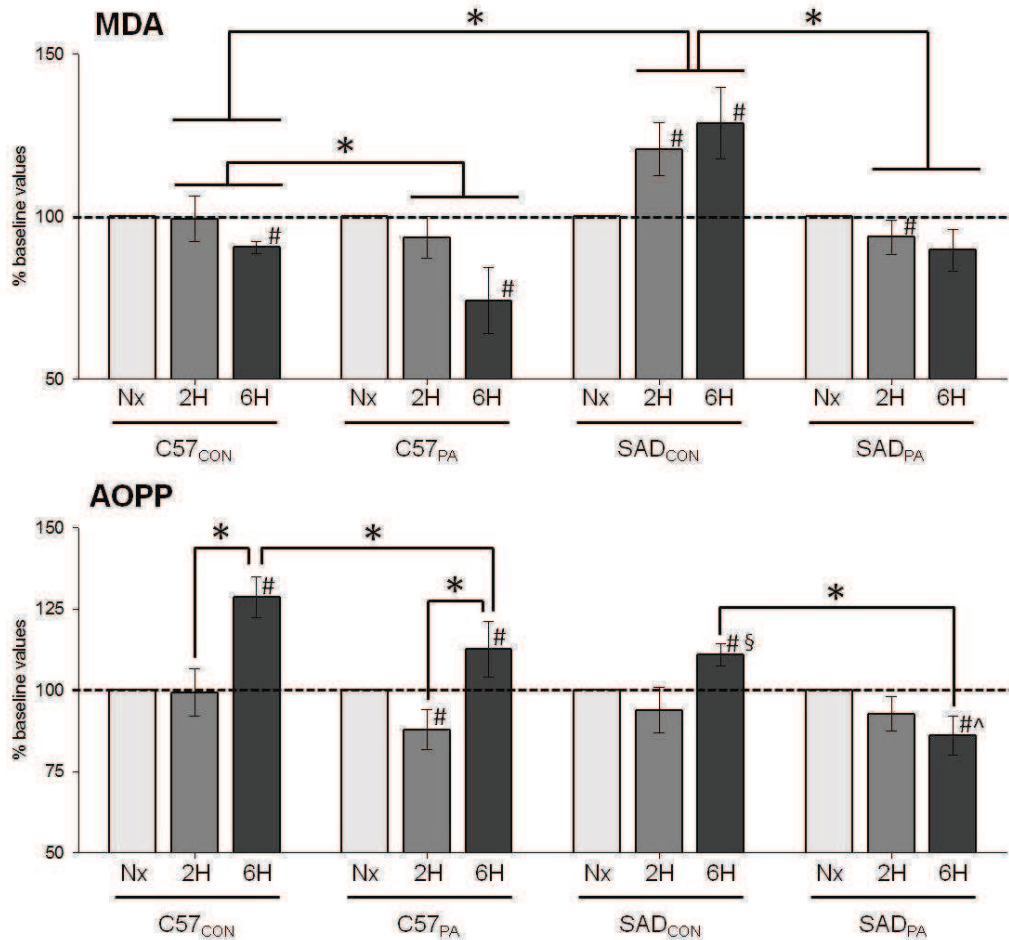


**Figure 1. Plasma concentrations of lactate dehydrogenase (LDH) after a voluntary wheel running program followed by H/R stress in C57Bl/6 (C57) and SAD mice.** CON: control mice; PA: physical activity mice; Nx: Normoxia; 2H: hypoxia + 2h of reoxygenation; 6H: hypoxia + 6h of reoxygenation; LDH: lactate dehydrogenase. \*:  $p<0.05$ . Values are means ± SE.

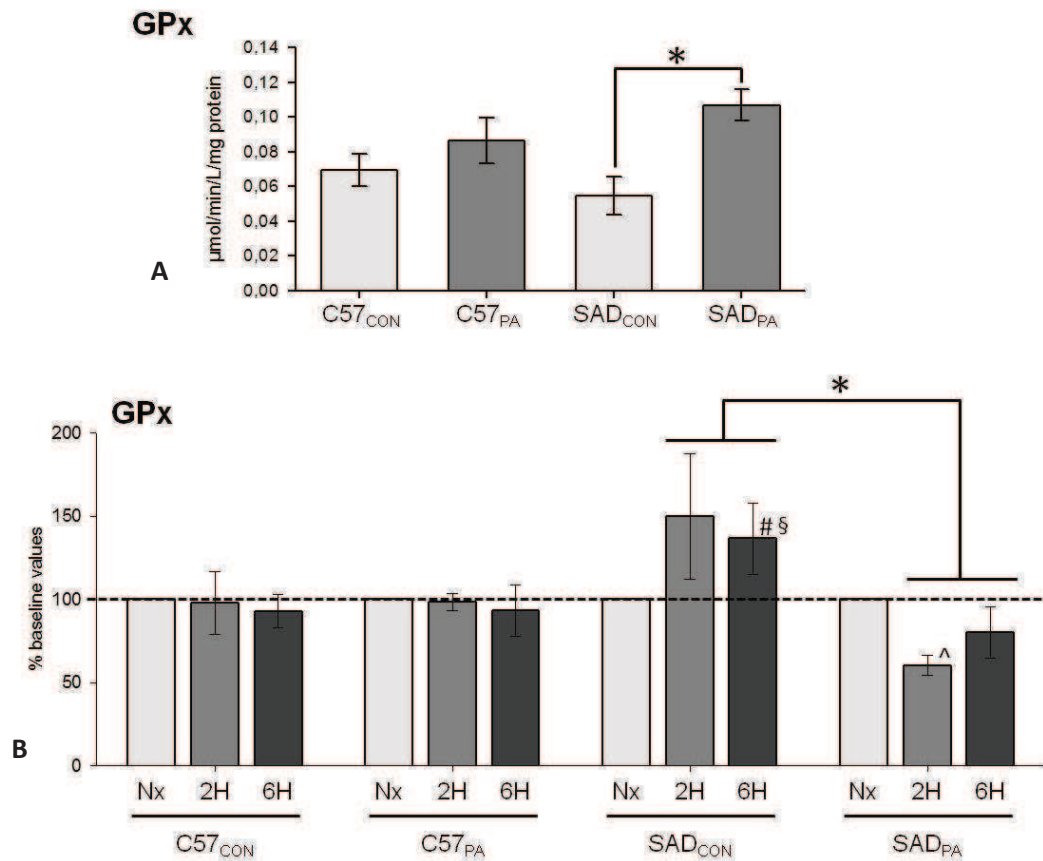




**Figure 2. Effect of a physical activity protocol on VCAM-1 immunostaining in the lung.** A) Immunohistologic slides were semi-quantified for VCAM-1 with the staining intensity and a score described in material and methods. CON: control mice; PA: physical activity mice; Nx: Normoxia; 2H: hypoxia + 2h of reoxygenation; 6H: hypoxia + 6h of reoxygenation. \*:  $p < 0.05$ ; #:  $p < 0.05$  versus SAD<sub>CON</sub>2H. Values are means  $\pm$  SE. B) Staining for VCAM-1 in the blood vessel of lung in the SAD mice in function of wheel running and after hypoxia and 2h of reoxygenation. Magnification X270.



**Figure 3. Malondialdehyde (MDA) and advanced oxidation protein products (AOPP) variations after hypoxia followed by 2h or 6h reoxygenation in the heart left ventricle of physical activity (PA) or control (CON) C57BI/6 (C57) and SAD mice.** MDA and AOPP were expressed in percentage of the normoxic values. CON: control mice; PA: wheel running mice; Nx: Normoxia; 2H: hypoxia + 2h of reoxygenation; 6H: hypoxia + 6h of reoxygenation. \*:  $p < 0.05$ ; #:  $p < 0.05$  versus normoxic conditions in the same group; §:  $p < 0.05$  versus C57<sub>CON</sub>6H; ^:  $p < 0.05$  versus C57<sub>PA</sub>6H. Values are means  $\pm$  SE.



**Figure 4. Glutathione peroxidase (GPx) activity after 8 weeks of physical activity protocol followed by H/R stress in C57BI/6 (C57) and SAD mice in the heart left ventricle.** A) Normoxic baseline values in the 4 groups expressed in  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}/\text{mg}$  of protein. B) GPX activity variations in response to the H/R stress. Results were expressed in percentage of the normoxic values. CON: control mice; PA: physical activity mice; Nx: Normoxia; 2H: hypoxia + 2h of reoxygenation; 6H: hypoxia + 6h of reoxygenation. \*:  $p < 0.05$ ; #:  $p < 0.05$  versus normoxic conditions in the same group; §:  $p < 0.05$  versus C57<sub>CON</sub>6H; ^:  $p < 0.05$  versus C57<sub>PA</sub>2H. Values are means  $\pm$  SE.

# **D. Conclusion**

## **générale et**

## **perspectives**

---

## Conclusion générale

---

L'objectif de ce travail de thèse était de développer un nouvel axe de recherche, dans le cadre de la drépanocytose, portant sur les effets de l'activité physique régulière chez les sujets porteurs de la mutation HbS (homozygotes et hétérozygotes). A travers une étude menée chez les sujets porteurs du trait drépanocytaire puis chez les souris transgéniques drépanocytaires SAD, nous avons montré qu'à l'inverse de l'exercice physique aigu, susceptible de favoriser le développement des CVO chez les patients drépanocytaires s'il est pratiqué de façon intense, la pratique régulière d'une activité physique pourrait être bénéfique pour ces sujets.

Ainsi, la réalisation d'une activité physique régulière chez les sujets PTD permet de limiter les concentrations en sVCAM-1 et ce, aussi bien au repos qu'en réponse à un exercice aigu. Cela pourrait suggérer une adaptation endothéliale à l'exercice répété et une moindre expression de VCAM-1 sur la paroi vasculaire de ces sujets. L'étude de Chirico et al. menée chez des PTD entraînés en réponse à un exercice aigu permet de proposer qu'en limitant le stress-oxydatif et en améliorant la biodisponibilité du NO (614), l'activité physique régulière pourrait participer à cette moindre expression de VCAM-1. Cela grâce à une moindre stimulation de la voie NFκB par un stress oxydatif limité et une biodisponibilité du NO accrue.

L'entraînement physique régulier pourrait ainsi permettre de réduire les adhésions cellulaires à l'endothélium qui jouent un rôle majeur dans la formation des occlusions vasculaires (92). Bien qu'étant généralement asymptomatiques au repos comme à l'exercice, les PTD peuvent présenter des altérations endothéliales et systémiques (adhérence vasculaire, stress-oxydatif, diminution de la biodisponibilité du NO) en réponse à l'exercice aigu (121-122,614-615). Ces altérations n'ont pas de conséquences fonctionnelles en situation standard. Cependant, on ne peut exclure de possibles implications délétères de ces paramètres lors de situations environnementales particulièrement stressantes pour l'organisme et dans ce cas, la pratique régulière d'une activité physique pourrait s'avérer bénéfique. De plus, sVCAM-1 étant, chez les sujets drépanocytaires, associé à de l'hypertension artérielle pulmonaire, à des défaillances organiques et à une mortalité accrue (249), une limitation de cette molécule pourrait être bénéfique pour ces patients et encourage à étudier les effets de l'activité physique régulière chez ces sujets.

L'expérimentation animale nous a permis d'amorcer cette réflexion. Nous avons ainsi pu observer les effets de 8 semaines d'activité physique volontaire en roue d'activité sur l'évolution de facteurs impliqués dans les CVO lors d'un stress d'H/R. Les résultats observés sont encourageants et confirment, de plus, ceux observés chez les PTD entraînés en réponse à un exercice aigu : l'expression, cette fois-ci endothéliale, de VCAM-1 pulmonaire ainsi que le stress oxydatif dans le cœur sont limités en réponse au stress vaso-occlusif d'H/R chez les souris SAD ayant participé à l'activité physique. De plus, les souris SAD physiquement actives semblent présenter une amélioration de l'activité antioxydante de base ainsi qu'une réduction de l'hémolyse. L'activité physique régulière semble donc limiter plusieurs marqueurs impliqués dans l'activation endothéliale et le stress oxydatif qui participent à la formation d'agrégats cellulaires et par conséquent à des occlusions vasculaires. Ces résultats sont bien entendus à confirmer par d'autres études incluant l'observation directe d'une réduction de l'importance des CVO par l'activité physique régulière.

Cependant, ils sont encourageant car pris tels quels, et appliqués à l'Homme, ils signifieraient que des patients drépanocytaires soumis à un entraînement physique régulier et adapté pourraient bénéficier d'une réduction de l'occurrence et/ou l'importance des CVO. En effet, dans des situations favorisant les CVO tels que l'hypoxie, la chaleur, l'exercice physique aigu etc... les adaptations induites par l'entraînement tels que des effets « antiadhésif » et antioxydant pourrait enrayer les mécanismes menant aux CVO. De plus, la pratique d'un entraînement physique régulier est connue pour améliorer la qualité de vie des patients, ce qui a été démontré par Tinti et al. chez une patiente drépanocytaire soumise à une réhabilitation post-CVO par l'exercice physique (relaxation, étirement, exercice aérobique) (639).

---

## Perspectives

---

Ce travail n'en étant qu'à ses prémices et les résultats observés étant en cohésion avec l'hypothèse formulée dans cette thèse, plusieurs perspectives peuvent être envisagées afin de poursuivre les investigations dans ce domaine. Ces perspectives naissent de la diversité des mécanismes impliqués dans la pathologie drépanocytaire tels que l'adhésion vasculaire et le stress-oxydatif déjà appréhendés dans cette thèse mais aussi l'inflammation, la modulation du tonus vasculaire impliquant notamment le NO et l'ET-1 et la formation de thrombus incluant l'adhésion plaquettaire et la cascade de coagulation.

Ainsi, dans des perspectives à court terme, il pourrait être intéressant, pour compléter l'étude 4, d'étudier les mécanismes listés ci-dessus et non analysés pour le moment chez les souris SAD ayant une activité physique régulière.

➤ Du point de vue de la modulation du tonus vasculaire, deux molécules s'opposent et s'inhibent, il s'agit de l'ET-1 et du NO. La première, via son action fortement vaso-constrictrice sur l'endothélium et la deuxième en stimulant la vasodilatation (287). Ainsi, comprendre laquelle domine chez les souris SAD soumises à une activité physique régulière pourrait aider mieux comprendre les effets de l'entraînement chez les drépanocytaires. Cependant, le mécanisme d'expression et/ou d'action de chaque molécule doit être étudié avec soin car le dosage seul de la molécule ne peut permettre de conclure entièrement sur son action.

Pour l'ET-1, son action biologique sur les CMLV s'effectue par la liaison à ses récepteurs ETA, ETB<sub>1</sub> et ETB<sub>2</sub>. ETA et ETB<sub>2</sub> sont connus pour stimuler la contraction des CMLV tandis qu'ETB<sub>1</sub>, situé sur les cellules endothéliales induit un effet opposé avec la stimulation du NO ayant pour effet la vasodilatation (297). Ainsi lors d'un dosage de l'ET-1, prendre en compte l'expression des différents types de récepteurs à l'endothéline-1 permettrait d'affiner la conclusion quant au type d'action induite par la molécule.

En parallèle, comprendre le métabolisme du NO implique beaucoup d'analyses. Les NOS sont impliquées dans la synthèse du NO ; la quantification de leurs expressions et activités pourrait offrir un bon indicateur de la formation du NO, à coupler avec le dosage de la L-citrulline formée en même temps que le NO par les NOS (301). Cependant, les NOS peuvent être découplés en absence de substrat, et produire de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> à la place du NO (301).

Le plus souvent, l'arginase libérée lors de l'hémolyse des GR entre en compétition avec la L-arginine, un des substrats limitant des NOS (86). Ainsi, un dosage de l'arginase pourrait donner un premier indicateur de l'état des NOS. Ensuite, une fois le NO produit, il peut (i) induire une action vasodilatatrice révélée par le dosage Nitrite/nitrate (NOx) (335), (ii) réagir avec l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et conduire à la formation du ROS peroxinitrite, ce qui peut être observé par le dosage de la nitrotyrosine (643) ou encore (iii) réagir avec le fer issu de l'hémolyse ce qui réduira sa biodisponibilité (299). Le dosage de plusieurs composantes incluant des marqueurs de l'hémolyse (LDH, arginase), l'expression et l'activité des NOS, la L-citrulline et la L-arginine, les NOx et la nitrotyrosine permettrait alors de disposer d'un bon point de vue général pour discuter de l'état de la biodisponibilité du NO chez les souris SAD physiquement actives (644).

➤ L'analyse de la thrombogenèse en réponse à une activité physique régulière est aussi un bon marqueur de l'effet positif ou non de ce dernier sur le développement des CVO. En effet, en stimulant la formation de thrombus, la thrombogenèse peut contribuer fortement à l'occlusion vasculaire (273) et favoriser les phénomènes d'ischémie/reperfusion. Ainsi, observer l'activation de la cascade de coagulation, de la fibrinolyse et de l'adhésion/agrégation plaquettaire serait un bon moyen d'appréhender ce mécanisme via le dosage de marqueurs plasmatiques de ces mécanismes (273).

Dans une perspective plus fondamentale, l'étude 1 menée durant cette thèse soulève une question mécanistique qui pourrait être intéressante à appréhender.

L'effet bénéfique de l'entraînement dans cette étude est suggéré grâce à une limitation de la molécule soluble sVCAM-1 censé être le reflet endothélial de VCAM-1, nous interrogeons sur la signification biologique de ces molécules solubles. Elles semblent, certes être le reflet de l'expression endothéliale des CAM comme le montre la revue de littérature effectuée dans cette thèse (A. Partie2.II.1.iv ; p57) et les résultats menés chez la SAD qui confirment ces variations. Cependant, quels rôles jouent-elles ? Ne pourraient-elles pas être des molécules protectrices de l'adhésion vasculaire ayant pour but de masquer les sites de fixation au niveau des cellules sanguines et de ce fait limiter l'adhérence cellulaire ?

Une étude montre, *in vitro*, que les P-sélectines solubles auraient plutôt pour effet de stimuler l'adhésion leucocyte-plaquette via les récepteurs PSGL-1 (206). Cependant la P-



sélectine a un mode d'expression différent de celui des CAM puisqu'elle peut être dégranulée par les corps de Weibel-palade indépendamment de la voie NFκB et initier l'adhésion au contraire des CAM qui en assurent les liaisons fortes cellules/endothélium. Ainsi il est possible d'imaginer des effets différents entre les molécules plasmatiques sP-sélectine et sVCAM-1/sICAM-1.

Il peut être envisagé que suite à la stimulation des CAM par la voie des NFκB (via cytokines pro-inflammatoires, ROS...), il se développe en parallèle l'activation d'un mécanisme de protection. Celui-ci pourrait alors stimuler 1) le clivage d'une partie des CAM de l'endothélium ou 2) la synthèse de CAM solubles par épissage alternatif. Il en résulterait une augmentation des CAM solubles qui, en se liant aux intégrines (VLA-4, LFA-1, Mac-1) situé sur les cellules sanguines, limiterait fortement l'adhésion cellulaire. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par des études mené *in vitro* et *in vivo* afin d'observer 1) par une cinétique de l'expression des CAM endothéliales et des CAM solubles afin de déterminer si l'apparition de l'une peut être liée à la disparition/ atténuation de l'autre ; 2) si la liaison des molécules solubles sur les cellules sanguines entraîne une réduction de l'adhésion cellules/endothélium et 3) si la stimulation de la voie NFκB entraîne une augmentation d'ARNm codant pour des CAM solubles ou des protéines participant au clivage des CAM.

# E. Bibliographie

1. **Marieb E, Hoehn K.** Anatomie et physiologie humaines- Adaptation de l'édition américaine. *Pearson*, 8<sup>ème</sup> Ed: 735 (2010).
2. **Testa U.** Fetal hemoglobin chemical inducers for treatment of hemoglobinopathies. *Ann Hematol*, 88: 505-28 (2009).
3. **Bauer D E, Orkin S H.** Update on fetal hemoglobin gene regulation in hemoglobinopathies. *Curr Opin Pediatr*, 23: 1-8 (2011).
4. **Schechter A N.** Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, 112: 3927-38 (2008).
5. **Pászty C, Brion C M, Mancini E, Witkowska H E, Stevens M E, Mohandas N, Rubin E M.** Transgenic knockout mice with exclusively human sickle hemoglobin and sickle cell disease. *Science*, 278: 876-8 (1997).
6. **Blouin M J, Beauchemin H, Wright A, De Paepe M, Sorette M, Bleau A M, Nakamoto B, Ou C N, Stamatoyannopoulos G, Trudel M.** Genetic correction of sickle cell disease: insights using transgenic mouse models. *Nat Med*, 6: 177-82 (2000).
7. **Birgens H, Ljung R.** The thalassaemia syndromes. *Scand J Clin Lab Invest*, 67: 11-25 (2007).
8. **Higgs D R, Weatherall D J.** The alpha thalassaemias. *Cell Mol Life Sci*, 66: 1154-62 (2009).
9. **Rund D, Rachmilewitz E.** Beta-thalassemia. *N Engl J Med*, 353: 1135-46 (2005).
10. **Ingram V M.** Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature*, 180: 326-8 (1957).
11. **Rees D C, Williams T N, Gladwin M T.** Sickle-cell disease. *Lancet*, 376: 2018-31 (2010).
12. **Okpala I.** Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. *Curr Opin Hematol*, 13: 40-4 (2006).
13. **Frenette P, Atweh G.** Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest*, 117: 850-8 (2007).
14. **Nagel R L, Fabry M E, Steinberg M H.** The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Rev*, 17: 167-78 (2003).
15. **Steinberg M H, Embury S H.** Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. *Blood*, 68: 985-90 (1986).
16. **Hsu L L, Miller S T, Wright E, Kutlar A, McKie V, Wang W, Pegelow C H, Driscoll C, Hurlet A, Woods G, Elsas L, Embury S, Adams R J.** Alpha Thalassaemia is associated with decreased risk of abnormal transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 25: 622-8 (2003).
17. **Bernaudo F, Verhac S, Chevret S, Torres M, Coic L, Arnaud C, Kamdem A, Hau I, Grazia Neonato M, Delacourt C.** 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 (2008).
18. **Kato G J, Gladwin M T, Steinberg M H.** Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*, 21: 37-47 (2007).
19. **Higgs D R, Aldridge B E, Lamb J, Clegg J B, Weatherall D J, Hayes R J, Grandison Y, Lowrie Y, Mason K P, Serjeant B E, Serjeant G R.** The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. *N Engl J Med*, 306: 1441-6 (1982).
20. **de Ceulaer K, Higgs D R, Weatherall D J, Hayes R J, Serjeant B E, Serjeant G R.** alpha-Thalassemia reduces the hemolytic rate in homozygous sickle-cell disease. *N Engl J Med*, 309: 189-90 (1983).
21. **Embury S H.** Alpha thalassemia. A modifier of sickle cell disease. *Ann N Y Acad Sci*, 565: 213-21 (1989).
22. **Joly P, Pondarre C, Bardel C, Francina A, Martin C.** A retrospective cross-validation study of the pediatric severity index for sickle cell disease children. *Eur J Haematol*, 88: 61-7 (2012).
23. **Gill F M, Sleeper L A, Weiner S J, Brown A K, Bellevue R, Grover R, Pegelow C H, Vichinsky E.** Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*, 86: 776-83 (1995).
24. **Billett H H, Nagel R L, Fabry M E.** Paradoxical increase of painful crises in sickle cell patients with alpha-thalassemia. *Blood*, 86: 4382 (1995).

25. Ballas S K, Talacki C A, Rao V M, Steiner R M. The prevalence of avascular necrosis in sickle cell anemia: correlation with alpha-thalassemia. *Hemoglobin*, 13: 649-55 (1989).
26. Serjeant G, Serjeant B. Sickle-cell anaemia before Herrick. *Lancet*, 1: 746-7 (1972).
27. Herrick J B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. *Yale J Biol Med*, 74: 179-84 (2001).
28. Mason V R. Sickle cell anemia. *JAMA*, 79: 1318 -20 (1922).
29. Baker J P. Sickle Cell Anemia. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 57: 203-12 (1941).
30. Hahn E V, Gillespie E B. Sickle cell anemia. Report of a case greatly improved by splenectomy. Experimental study of sickle cell formation. *Arch Intern Med*, 39: 233-54 (1927).
31. Sherman I J. The sickling phenomenon, with special reference to the differentiation of sickle cell anemia from the sickle cell trait. *Bull. Johns Hopkins Hosp*, 67: 309-24 (1940).
32. Diggs L W, Ahmann C F, Bibb J. The incidence and significance of the sickle cell trait. *Ann Intern Med*, 7: 769 -78 (1933).
33. Neel J V. The Inheritance of Sickle Cell Anemia. *Science*, 110: 64-6 (1949).
34. Pauling L, Itano H A. Sickle cell anemia a molecular disease. *Science*, 110: 543-8 (1949).
35. Marotta C A, Forget B G, Cohe-Solal M, Wilson J T, Weissman S M. Human beta-globin messenger RNA. I. Nucleotide sequences derived from complementary RNA. *J Biol Chem*, 252: 5019-31 (1977).
36. Deisseroth A, Nienhuis A, Lawrence J, Giles R, Turner P, Ruddle F H. Chromosomal localization of human beta globin gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75: 1456-60 (1978).
37. Charache S, Terrin M L, Moore R D, Dover G J, Barton F B, Eckert S V, McMahon R P, Bonds D R. 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: 1317-22 (1995).
38. Allison A C. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J*, 1: 290-4 (1954).
39. Aidoo M, Terlouw D J, Kolczak M S, McElroy P D, ter Kuile F O, Kariuki S, Nahlen B L, Lal A A, Udhayakumar V. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet*, 359: 1311-2 (2002).
40. Williams T N, Mwangi T W, Wambua S, Alexander N D, Kortok M, Snow R W, Marsh K. Sickle cell trait and the risk of Plasmodium falciparum malaria and other childhood diseases. *J Infect Dis*, 192: 178-86 (2005).
41. Friedman M J, Roth E F, Nagel R L, Trager W. Plasmodium falciparum: Physiological interactions with the human sickle cell. *Exp Parasitol*, 47: 73-80 (1979).
42. Ayi K, Turrini F, Piga A, Arese P. Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. *Blood*, 104: 3364-71 (2004).
43. Shear H L, Roth E F, Jr., Fabry M E, Costantini F D, Pachnis A, Hood A, Nagel R L. Transgenic mice expressing human sickle hemoglobin are partially resistant to rodent malaria. *Blood*, 81: 222-6 (1993).
44. Abu-Zeid Y A, Abdulhadi N H, Theander T G, Hviid L, Saeed B O, Jepsen S, Jensen J B, Bayoumi R A. Seasonal changes in cell mediated immune responses to soluble Plasmodium falciparum antigens in children with haemoglobin AA and haemoglobin AS. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 86: 20-2 (1992).
45. Bayoumi R A, Abu-Zeid Y A, Abdulhadi N H, Saeed B O, Theander T G, Hviid L, Ghalib H W, Nugud A H D, Jepsen S, Jensen J B. Cell-mediated immune responses to Plasmodium falciparum purified soluble antigens in sickle-cell trait subjects. *Immunol Lett*, 25: 243-9 (1990).
46. Bardakjian J, Wajcman H. Épidémiologie de la drépanocytose. *Rev Prat*, 54: 1531-3 (2004).
47. Trudel M, De Paepe M E, Chretien N, Saadane N, Jacmain J, Sorette M, Hoang T, Beuzard Y. Sickle cell disease of transgenic SAD mice. *Blood*, 84: 3189-97 (1994).
48. Vekilov P G. Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? *Br J Haematol*, 139: 173-84 (2007).
49. Seakins M, Gibbs W N, Milner P F, Bertles J F. Erythrocyte Hb-S concentration. An important factor in the low oxygen affinity of blood in sickle cell anemia. *J Clin Invest*, 52: 422-32 (1973).

50. **Abdu A, Gómez-Márquez J, Aldrich T K.** The oxygen affinity of sickle hemoglobin. *Respir Physiol Neurobiol*, 161: 92-4 (2008).
51. **Ueda Y, Nagel R L, Bookchin R M.** An increased Bohr effect in sickle cell anemia. *Blood*, 53: 472-80 (1979).
52. **Bookchin R M, Balazs T, Landau L C.** Determinants of red cell sickling. Effects of varying pH and of increasing intracellular hemoglobin concentration by osmotic shrinkage. *J Lab Clin Med*, 87: 597-616 (1976).
53. **Hofrichter J, Ross P D, Eaton W A.** Kinetics and mechanism of deoxyhemoglobin S gelation: a new approach to understanding sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71: 4864-8 (1974).
54. **Charache S, Grisolia S, Fiedler A J, Hellegers A E.** Effect of 2,3-diphosphoglycerate on oxygen affinity of blood in sickle cell anemia. *J Clin Invest*, 49: 806-12 (1970).
55. **Poillon W N, Kim B C.** 2,3-Diphosphoglycerate and intracellular pH as interdependent determinants of the physiologic solubility of deoxyhemoglobin S. *Blood*, 76: 1028-36 (1990).
56. **Bookchin R M, Lew V L.** Pathophysiology of sickle cell anemia. *Hematol Oncol Clin North Am*, 10: 1241-53 (1996).
57. **De Franceschi L, Beuzard Y, Jouault H, Brugnara C.** Modulation of erythrocyte potassium chloride cotransport, potassium content, and density by dietary magnesium intake in transgenic SAD mouse. *Blood*, 88: 2738-44 (1996).
58. **Noguchi C T, Torchia D A, Schechter A N.** Intracellular polymerization of sickle hemoglobin. Effects of cell heterogeneity. *J Clin Invest*, 72: 846-52 (1983).
59. **Kaul D K, Fabry M E.** In vivo studies of sickle red blood cells. *Microcirculation*, 11: 153-65 (2004).
60. **Barabino G A, Platt M O, Kaul D K.** Sickle cell biomechanics. *Ann Rev Biomed Eng*, 12: 345-67 (2010).
61. **Marieb E, Hoehn K.** Anatomie et physiologie humaines- Adaptation de la 8<sup>ème</sup> édition américaine. *Pearson*, 8<sup>ème</sup> Ed: 1162 (2010).
62. **De Franceschi L, Brugnara C, Rouyer-Fessard P, Jouault H, Beuzard Y.** Formation of dense erythrocytes in SAD mice exposed to chronic hypoxia: evaluation of different therapeutic regimens and of a combination of oral clotrimazole and magnesium therapies. *Blood*, 94: 4307-13 (1999).
63. **Bennekou P, de Franceschi L, Pedersen O, Lian L, Asakura T, Evans G, Brugnara C, Christophersen P.** Treatment with NS3623, a novel Cl<sup>-</sup> conductance blocker, ameliorates erythrocyte dehydration in transgenic SAD mice: a possible new therapeutic approach for sickle cell disease. *Blood*, 97: 1451-7 (2001).
64. **Rhoda M D, Apovo M, Beuzard Y, Giraud F.** Ca<sup>2+</sup> permeability in deoxygenated sickle cells. *Blood*, 75: 2453-8 (1990).
65. **Rivera A, Rotter M A, Brugnara C.** Endothelins activate Ca<sup>2+</sup>-gated K<sup>+</sup> channels via endothelin B receptors in CD-1 mouse erythrocytes. *Am J Physiol*, 277: C746-54 (1999).
66. **Rivera A, Jarolim P, Brugnara C.** Modulation of Gardos channel activity by cytokines in sickle erythrocytes. *Blood*, 99: 357-603 (2002).
67. **Rivera A.** Reduced sickle erythrocyte dehydration in vivo by endothelin-1 receptor antagonists. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293: C960-6 (2007).
68. **De Franceschi L, Villa-Moruzzi E, Biondani A, Siciliano A, Brugnara C, Alper S L, Lowell C A, Berton G.** Regulation of K-Cl cotransport by protein phosphatase 1 $\alpha$  in mouse erythrocytes. *Pflugers Arch*, 451: 760-8 (2006).
69. **Hebbel R P, Eaton J W, Balasingam M, Steinberg M H.** Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J Clin Invest*, 70: 1253-9 (1982).
70. **Nur E, Biemond B J, Otten H M, Brandjes D P, Schnog J J.** Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. *Am J Hematol*, 86: 484-9 (2011).
71. **Rust M B, Alper S L, Rudhard Y, Shmukler B E, Vicente R, Brugnara C, Trudel M, Jentsch T J, Hubner C A.** Disruption of erythroid K-Cl cotransporters alters erythrocyte volume and partially rescues erythrocyte dehydration in SAD mice. *J Clin Invest*, 117: 1708-17 (2007).

72. Clark M R, Mohandas N, Shohet S B. Deformability of oxygenated irreversibly sickled cells. *J Clin Invest*, 65: 189-96 (1980).
73. Kaul D K, Fabry M E, Windisch P, Baez S, Nagel R L. Erythrocytes in sickle cell anemia are heterogeneous in their rheological and hemodynamic characteristics. *J Clin Invest*, 72: 22-31 (1983).
74. Kaul D K, Fabry M E, Nagel R L. Microvascular sites and characteristics of sickle cell adhesion to vascular endothelium in shear flow conditions: pathophysiological implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 3356-60 (1989).
75. Fabry M E, Fine E, Rajanayagam V, Factor S M, Gore J, Sylla M, Nagel R L. Demonstration of endothelial adhesion of sickle cells in vivo: a distinct role for deformable sickle cell discocytes. *Blood*, 79: 1602-11 (1992).
76. Itoh T, Chien S, Usami S. Effects of hemoglobin concentration on deformability of individual sickle cells after deoxygenation. *Blood*, 85: 2245-53 (1995).
77. Chien S, Usami S, Bertles J F. Abnormal rheology of oxygenated blood in sickle cell anemia. *J Clin Invest*, 49: 623-34 (1970).
78. Hebbel R P, Miller W J. Phagocytosis of sickle erythrocytes: immunologic and oxidative determinants of hemolytic anemia. *Blood*, 64: 733-41 (1984).
79. 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. 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: 1060-5 (2009).
80. Foller M, Huber S M, Lang F. Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life*, 60: 661-8 (2008).
81. Bauer T W, Moore G W, Hutchins G M. The liver in sickle cell disease. A clinicopathologic study of 70 patients. *Am J Med*, 69: 833-7 (1980).
82. Banerjee T, Kuypers F A. Reactive oxygen species and phosphatidylserine externalization in murine sickle red cells. *Br J Haematol*, 124: 391-402 (2004).
83. Fadok V A, Bratton D L, Rose D M, Pearson A, Ezekewitz R A, Henson P M. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, 405: 85-90 (2000).
84. Wood K C, Hebbel R P, Granger D N. Endothelial cell NADPH oxidase mediates the cerebral microvascular dysfunction in sickle cell transgenic mice. *FASEB J*, 19: 989-91 (2005).
85. Krajewski M L, Hsu L L, Gladwin M T. The proverbial chicken or the egg? Dissection of the role of cell-free hemoglobin versus reactive oxygen species in sickle cell pathophysiology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295: H4-7 (2008).
86. Belcher J D, Beckman J D, Balla G, Balla J, Vercellotti G. Heme degradation and vascular injury. *Antioxid Redox Signal*, 12: 233-48 (2010).
87. Balla J, Jacob H S, Balla G, Nath K, Eaton J W, Vercellotti G M. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 9285-9 (1993).
88. Lipowsky H H. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation*, 12: 5-15 (2005).
89. Cicha I, Goppelt-Struebe M, Yilmaz A, Daniel W G, Garlich C D. Endothelial dysfunction and monocyte recruitment in cells exposed to non-uniform shear stress. *Clin Hemorheol Microcirc*, 39: 113-9 (2008).
90. Urschel K, Wörner A, Daniel W G, Garlich C D, Cicha I. Role of shear stress patterns in the TNF- $\alpha$ -induced atherogenic protein expression and monocytic cell adhesion to endothelium. *Clin Hemorheol Microcirc*, 46: 203-10 (2010).
91. Adams R J, McKie V C, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, Abboud M, Gallagher D, Kutlar A, Nichols F T, Bonds D R, Brambilla D. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med*, 339: 5-11 (1998).
92. Kaul D K, Finnegan E, Barabino G A. Sickle red cell-endothelium interactions. *Microcirculation*, 16: 97-111 (2009).
93. Conran N, Costa F F. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clin Biochem*, 42: 1824-38 (2009).



94. Schnog J J, Lard L R, Rojer R A, Van der Dijs F P, Muskiet F A, Duits A J. New concepts in assessing sickle cell disease severity. *Am J Hematol*, 58: 61-6 (1998).
95. van Beers E J, van Tuijn C F, Mac Gillavry M R, van der Giessen A, Schnog J J, Biemond B J. Sickle cell disease-related organ damage occurs irrespective of pain rate: implications for clinical practice. *Haematologica*, 93: 757-60 (2008).
96. Platt O S, Brambilla D J, Rosse W F, Milner P F, Castro O, Steinberg M H, Klug P P. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*, 330: 1639-44 (1994).
97. Trompeter S, Roberts I. Haemoglobin F modulation in childhood sickle cell disease. *Br J Haematol*, 144: 308-16 (2009).
98. Khatib R, Rabah R, Sarnaik S A. The spleen in the sickling disorders: an update. *Pediatr Radiol*, 39: 17-22 (2009).
99. Yates A M, Hankins J S, Mortier N A, Aygun B, Ware R E. Simultaneous acute splenic sequestration and transient aplastic crisis in children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*, 53: 479-81 (2009).
100. Onwubalili J K. Sickle cell disease and infection. *J Infect*, 7: 2-20 (1983).
101. Hillery C A, Panepinto J A. Pathophysiology of stroke in sickle cell disease. *Microcirculation*, 11: 195-208 (2004).
102. Atweh G F. Hydroxyurea in sickle cell disease: What will it take to change practice? *Am J Hematol*, 85: 401-2 (2010).
103. Charache S, Dover G J, Moore R D, Eckert S, Ballas S K, Koshy M, Milner P F, Orringer E P, Phillips G, Jr., Platt O S. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood*, 79: 2555-65 (1992).
104. Steinberg M H. Management of sickle cell disease. *N Engl J Med*, 340: 1021-30 (1999).
105. Ellison A M, Shaw K. Management of vasoocclusive pain events in sickle cell disease. *Pediatr Emerg Care*, 23: 832-8 (2007).
106. Cappellini M D, Bejaoui M, Agaoglu L, Canatan D, Capra M, Cohen A, Drelichman G, Economou M, Fattoum S, Kattamis A, Kilinc Y, Perrotta S, Piga A, Porter J B, Griffel L, Dong V, Clark J, Aydinok Y. Iron chelation with deferasirox in adult and pediatric patients with thalassemia major: efficacy and safety during 5 years' follow-up. *Blood*, 118: 884-93 (2011).
107. Bolaños-Meade J, Brodsky R A. Blood and marrow transplantation for sickle cell disease: overcoming barriers to success. *Curr Opin Oncol*, 21: 158-61 (2009).
108. Stocker J W, De Franceschi L, McNaughton-Smith G A, Corrocher R, Beuzard Y, Brugnara C. ICA-17043, a novel Gardos channel blocker, prevents sickled red blood cell dehydration in vitro and in vivo in SAD mice. *Blood*, 101: 2412-8 (2003).
109. Sabaa N, de Franceschi L, Bonnin P, Castier Y, Malpeli G, Debbabi H, Galaup A, Maier-Redelsperger M, Vandermeersch S, Scarpa A, Janin A, Levy B, Girot R, Beuzard Y, Leboeuf C, Henri A, Germain S, Dussaule J-C, Tharaux P-L. Endothelin receptor antagonism prevents hypoxia-induced mortality and morbidity in a mouse model of sickle-cell disease. *J Clin Invest*, 118: 1924-33 (2008).
110. Le Gallais D, Lonsdorfer J, Bogui P, Fattoum S. Point: Sickle cell trait should be considered asymptomatic and as a benign condition during physical activity. *J Appl Physiol*, 103: 2137-8; discussion 41 (2007).
111. Thogmartin J R, Wilson C I, Palma N A, Ignacio S S, Shuman M J, Flannagan L M. Sickle Cell Trait-Associated Deaths: A Case Series with a Review of the Literature. *J Forensic Sci*, 56: 1352-60 (2011).
112. Aloe A, Krishnamurti L, Kladny B. Testing of collegiate athletes for sickle cell trait: what we, as genetic counselors should know. *J Genet Couns*, 20: 337-40 (2011).
113. Jones S R, Binder R A, Donowho E M, Jr. Sudden death in sickle-cell trait. *N Engl J Med*, 282: 323-5 (1970).
114. Connes P, Hardy-Dessources M-D, Hue O. Counterpoint: Sickle cell trait should not be considered asymptomatic and as a benign condition during physical activity. *J Appl Physiol*, 103: 2138-40; discussion 40-41 (2007).
115. Ajayi A A L. Should the sickle cell trait be reclassified as a disease state? *Eur J Int Med*, 16: 463 (2005).

116. Bowers A S, Pepple D J, Reid H L. Optimal haematocrit in subjects with normal haemoglobin genotype (HbAA), sickle cell trait (HbAS), and homozygous sickle cell disease (HbSS). *Clin Hemorheol Microcirc*, 47: 253-60 (2011).
117. Monchanin G, Connes P, Wouassi D, Francina A, Djoda B, Banga P E, Owona F X, Thiriet P, Massarelli R, Martin C. Hemorheology, sickle cell trait, and alpha-thalassemia in athletes: effects of exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 37: 1086-92 (2005).
118. Connes P, Sara F, Hardy-Dessources M, Etienne-Julan M, Hue O. Does higher red blood cell (RBC) lactate transporter activity explain impaired RBC deformability in sickle cell trait? *Jpn J Physiol*, 55: 385-7 (2005).
119. Connes P, Sara F, Hardy-Dessources M-D, Marlin L, Etienne F, Larifla L, Saint-Martin C, Hue O. Effects of short supramaximal exercise on hemorheology in sickle cell trait carriers. *Eur J Appl Physiol*, 97: 143-50 (2006).
120. Westerman M P, Green D, Gilman-Sachs A, Beaman K, Freels S, Boggio L, Allen S, Schlegel R, Williamson P. Coagulation changes in individuals with sickle cell trait. *Am J Hematol*, 69: 89-94 (2002).
121. Monchanin G, Serpero L D, Connes P, Tripette J, Wouassi D, Francina A, Massarelli R, Gozal D, Thiriet P, Martin C. Plasma levels of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in athletes with sickle cell trait with or without  $\alpha$ -thalassemia during endurance exercise and recovery. *Clin Hemorheol Microcirc*, 40: 89-97 (2008).
122. Monchanin G, Serpero L D, Connes P, Tripette J, Wouassi D, Bezin L, Francina A, Ngongang J, de la Pena M, Massarelli R, Gozal D, Thiriet P, Martin C. Effects of progressive and maximal exercise on plasma levels of adhesion molecules in athletes with sickle cell trait with or without alpha-thalassemia. *J Appl Physiol*, 102: 169-73 (2007).
123. Tripette J, Connes P, Hedreville M, Etienne-Julan M, Marlin L, Hue O, Hardy-Dessources M D. Patterns of exercise-related inflammatory response in sickle cell trait carriers. *Br J Sports Med*, 44: 232-7 (2010).
124. Vincent L, Feasson L, Oyono-Enguelle S, Banimbek V, Denis C, Guarneri C, Aufradet E, Monchanin G, Martin C, Gozal D, Dohbobga M, Wouassi D, Garet M, Thiriet P, Messonnier L. Remodeling of skeletal muscle microvasculature in sickle cell trait and alpha-thalassemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H375-84 (2010).
125. Kark J A, Posey D M, Schumacher H R, Rühle C J. Sickle-cell trait as a risk factor for sudden death in physical training. *N Engl J Med*, 317: 781-7 (1987).
126. Trudel M, Garel M C, Saadane N, Rouyer-Fessard P, Vidaud D, Costantini F, Beuzard Y. Towards a mouse model for sickle cell disease: HB SAD. *Nouv Rev Fr Hematol*, 32: 407-8 (1990).
127. Trudel M, Saadane N, Garel M C, Bardakdjian-Michau J, Blouquit Y, Guerquin-Kern J L, Rouyer-Fessard P, Vidaud D, Pachnis A, Romeo P H, et al. Towards a transgenic mouse model of sickle cell disease: hemoglobin SAD. *EMBO J*, 10: 3157-65 (1991).
128. Siciliano A, Malpeli G, Platt O S, Lebouef C, Janin A, Scarpa A, Olivieri O, Amato E, Corrocher R, Beuzard Y, De Franceschi L. Abnormal modulation of cell protective systems in response to ischemic/reperfusion injury is important in the development of mouse sickle cell hepatopathy. *Haematologica*, 96: 24-32 (2011).
129. De Paepe M, Trudel M. The transgenic SAD mouse: a model of human sickle cell glomerulopathy. *Kidney Int*, 46: 1337-45 (1994).
130. Bonnin P, Sabaa N, Flamant M, Debbabi H, Tharaux P L. Ultrasound imaging of renal vaso-occlusive events in transgenic sickle mice exposed to hypoxic stress. *Ultrasound Med Biol*, 34: 1076-84 (2008).
131. De Franceschi L, Beuzard Y, Brugnara C. Sulfhydryl oxidation and activation of red cell K(+)-Cl<sup>-</sup> cotransport in the transgenic SAD mouse. *Am J Physiol*, 269: C899-906 (1995).
132. Bartolucci P, Ngo M-T, Beuzard Y, Galactéros F, Saber G, Rideau D, Eddahibi S, Maitre B, Adnot S, Delclaux C. Decrease in lung nitric oxide production after peritonitis in mice with sickle cell disease. *Crit Care Med*, 35: 502-9 (2007).



133. Martinez-Ruiz R,Montero-Huerta P,Hromi J,Head C A. Inhaled nitric oxide improves survival rates during hypoxia in a sickle cell (SAD) mouse model. *Anesthesiology*, 94: 1113-8 (2001).
134. De Franceschi L,Baron A,Scarpa A,Adrie C,Janin A,Barbi S,Kister J,Rouyer-Fessard P,Corrocher R,Leboulch P,Beuzard Y. Inhaled nitric oxide protects transgenic SAD mice from sickle cell disease-specific lung injury induced by hypoxia/reoxygenation. *Blood*, 102: 1087-96 (2003).
135. Mancini E A,Hillery C A,Bodian C A,Zhang Z G,Lutty G A,Coller B S. Pathology of Berkeley sickle cell mice: similarities and differences with human sickle cell disease. *Blood*, 107: 1651-8 (2006).
136. Fabry M E,Nagel R L,Pachnis A,Suzuka S M,Costantini F. High expression of human beta S- and alpha-globins in transgenic mice: hemoglobin composition and hematological consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 12150-4 (1992).
137. Skow L C,Burkhardt B A,Johnson F M,Popp R A,Popp D M,Goldberg S Z,Anderson W F,Barnett L B,Lewis S E. A mouse model for [beta]-thalassemia. *Cell*, 34: 1043-52 (1983).
138. Kaul D K,Hebbel R P. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest*, 106: 411-20 (2000).
139. Osarogiagbon U R,Choong S,Belcher J D,Vercellotti G M,Paller M S,Hebbel R P. Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. *Blood*, 96: 314-20 (2000).
140. Dasgupta T,Hebbel R P,Kaul D K. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. *Free Radic Biol Med*, 41: 1771-80 (2006).
141. Solovey A,Kollander R,Shet A,Milbauer L C,Choong S,Panoskaltis-Mortari A,Blazar B R,Kelm R J,Hebbel R P. Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin. *Blood*, 104: 840-6 (2004).
142. Fabry M E,Costantini F,Pachnis A,Suzuka S M,Bank N,Aynedjian H S,Factor S M,Nagel R L. High Expression of Human betaS- and alpha-Globins in Transgenic Mice: Erythrocyte Abnormalities, Organ Damage, and the Effect of Hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 12155-9 (1992).
143. Fabry M E,Sengupta A,Suzuka S M,Costantini F,Rubin E M,Hofrichter J,Christoph G,Mancini E,Culbertson D,Factor S M,Nagel R L. A second generation transgenic mouse model expressing both hemoglobin S (HbS) and HbS-Antilles results in increased phenotypic severity. *Blood*, 86: 2419-28 (1995).
144. Beuzard Y. Mouse models of sickle cell disease. *Transfus Clin Biol*, 15: 7-11 (2008).
145. Nath K A,Shah V,Haggard J J,Croatt A J,Smith L A,Hebbel R P,Katusic Z S. Mechanisms of vascular instability in a transgenic mouse model of sickle cell disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279: R1949-55 (2000).
146. Kaul D K,Fabry M E,Costantini F,Rubin E M,Nagel R L. In vivo demonstration of red cell-endothelial interaction, sickling and altered microvascular response to oxygen in the sickle transgenic mouse. *J Clin Invest*, 96: 2845-53 (1995).
147. Schmid-Schönbein G W. Analysis of inflammation. *Ann Rev Biomed Eng*, 8: 93-131 (2006).
148. Balakumar P,Kaur T,Singh M. Potential target sites to modulate vascular endothelial dysfunction: current perspectives and future directions. *Toxicology*, 245: 49-64 (2008).
149. Davis C,Fischer J,Ley K,Sarembock I J. The role of inflammation in vascular injury and repair. *J thromb Haemost*, 1: 1699-709 (2003).
150. Afshar-Kharghan V,Thiagarajan P. Leukocyte adhesion and thrombosis. *curr opin hematol*, 13: 34-9 (2006).
151. Luster A D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*, 338: 436-45 (1998).
152. Frenette P S,Johnson R C,Hynes R O,Wagner D D. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 7450-4 (1995).
153. André P,Denis C V,Ware J,Saffaripour S,Hynes R O,Ruggeri Z M,Wagner D D. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood*, 96: 3322-8 (2000).
154. Ruggeri Z M,Mendolicchio G L. Adhesion mechanisms in platelet function. *100: 1673-85 (2007)*.
155. Adams D H,Shaw S. Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet*, 343: 831-6 (1994).

156. Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13: 413-21 (2002).
157. Isaacs A, Lindenmann J. Virus Interference. I. The Interferon. *Proc R Soc Lond B*, 147: 258 -67 (1957).
158. Kopf M, Bachmann M F, Marsland B J. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat Rev Drug Discov*, 9: 703-18 (2010).
159. Revillard J-P, ASSIM. Immunologie. *De Boeck Université*, 4ième Ed: 117-135 (2001).
160. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res*, 79: 360-76 (2008).
161. Goodman R B, Pugin J, Lee J S, Matthay M A. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14: 523-35 (2003).
162. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*, 9: 361-71 (2009).
163. Petersen A, Pedersen B. The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. *J Physiol Pharmacol.*, 57: 43-51 (2006).
164. Steensberg A, Fischer C P, Keller C, Moller K, Pedersen B K. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285: E433-7 (2003).
165. Akohoue S A, Shankar S, Milne G L, Morrow J, Chen K Y, Ajayi W U, Buchowski M S. Energy expenditure, inflammation, and oxidative stress in steady-state adolescents with sickle cell anemia. *Pediatr Res*, 61: 233-8 (2007).
166. Hibbert J M, Hsu L L, Bhatena S J, Irune I, Sarfo B, Creary M S, Gee B E, Mohamed A I, Buchanan I D, Al-Mahmoud A, Stiles J K. Proinflammatory cytokines and the hypermetabolism of children with sickle cell disease. *Exp Biol Med (Maywood)*, 230: 68-74 (2005).
167. Kuvibidila S, Gardner R, Ode D, Yu L, Lane G, Warriar R P. Tumor necrosis factor alpha in children with sickle cell disease in stable condition. *J Natl Med Assoc*, 89: 609-15 (1997).
168. Mohan J S, Lip G Y, Wright J, Bareford D, Blann A D. Plasma levels of tissue factor and soluble E-selectin in sickle cell disease: relationship to genotype and to inflammation. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 16: 209-14 (2005).
169. Nur E, van Beers E J, Martina S, Cuccovillo I, Otten H M, Schnog J J, Meijers J C, Mantovani A, Brandjes D P, Bottazzi B, Biemond B J. Plasma levels of pentraxin-3, an acute phase protein, are increased during sickle cell painful crisis. *Blood Cells Mol Dis*, 46: 189-94 (2011).
170. Schnog J B, Mac Gillavry M R, van Zanten A P, Meijers J C, Rojer R A, Duits A J, ten Cate H, Brandjes D P. Protein C and S and inflammation in sickle cell disease. *Am J Hematol*, 76: 26-32 (2004).
171. Krishnan S, Setty Y, Betal S G, Vijender V, Rao K, Dampier C, Stuart M. Increased levels of the inflammatory biomarker C-reactive protein at baseline are associated with childhood sickle cell vasocclusive crises. *Br J Haematol*, 148: 797-804 (2010).
172. 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. Exercise in sickle cell anemia: effect on inflammatory and vasoactive mediators. *Endothelium*, 8: 147-55 (2001).
173. Qari M H, Dier U, Mousa S A. Biomarkers of Inflammation, Growth Factor, and Coagulation Activation in Patients With Sickle Cell Disease. *Clin Appl Thromb Hemost*, 18: 195-200 (2012).
174. Lanaro C, Franco-Penteado C F, Albuquerque D M, Saad S T O, Conran N, Costa F F. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol*, 85: 235-42 (2009).
175. Michaels L A, Ohene-Frempong K, Zhao H, Douglas S D. Serum levels of substance P are elevated in patients with sickle cell disease and increase further during vaso-occlusive crisis. *Blood*, 92: 3148-51 (1998).
176. Pathare A, Al Kindi S, Alnaqdy A A, Daar S, Knox-Macaulay H, Dennison D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *Am J Hematol*, 77: 323-8 (2004).
177. Musa B O P, Onyemelukwe G C, Hambolu J O, Mamman A I, Isa A H. Pattern of serum cytokine expression and T-cell subsets in sickle cell disease patients in vaso-occlusive crisis. *Clin Vaccine Immunol*, 17: 602-8 (2010).

178. Francis R B, Jr., Haywood L J. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc*, 84: 611-5 (1992).
179. Kasschau M R, Barabino G A, Bridges K R, Golan D E. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. *Blood*, 87: 771-80 (1996).
180. Malavé I, Perdomo Y, Escalona E, Rodriguez E, Anchustegui M, Malavé H, Arends T. Levels of tumor necrosis factor alpha/cachectin (TNF alpha) in sera from patients with sickle cell disease. *Acta Haematol*, 90: 172-6 (1993).
181. Tavakkoli F, Nahavandi M, Wyche M Q, Perlin E. Plasma levels of TNF-alpha in sickle cell patients receiving hydroxyurea. *Hematology*, 9: 61-4 (2004).
182. Taylor S C, Shacks S J, Mitchell R A, Banks A. Serum interleukin-6 levels in the steady state of sickle cell disease. *J Interferon Cytokine Res*, 15: 1061-4 (1995).
183. Nebor D, Bowers A, Hardy-Dessources M D, Knight-Madden J, Romana M, Reid H, Barthelemy J C, Cumming V, 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*, 96: 1589-94 (2011).
184. Cerqueira B A, Boas W V, Zanette A D, Reis M G, Goncalves M S. Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: Contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. *Cytokine*, 56: 471-6 (2011).
185. Conran N, Saad S T O, Costa F F, Ikuta T. Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease. *Ann Hematol*, 86: 255-61 (2007).
186. Makis A C, Hatzimichael E C. The role of cytokines in sickle cell disease. *Ann Hematol*, 79: 407-13 (2000).
187. Pathare A, Kindi S A, Daar S, Dennison D. Cytokines in sickle cell disease. *Hematology*, 8: 329-37 (2003).
188. Taylor S C, Shacks S J, Qu Z. In vivo production of type 1 cytokines in healthy sickle cell disease patients. *J Natl Med Assoc*, 91: 619-24 (1999).
189. Asare K, Gee B E, Stiles J K, Wilson N O, Driss A, Quarshie A, Adams R J, Kutlar A, Hibbert J M. Plasma interleukin-1beta concentration is associated with stroke in sickle cell disease. *Cytokine*, 49: 39-44 (2010).
190. Duits A J, Schnog J B, Lard L R, Saleh A W, Rojer R A. Elevated IL-8 levels during sickle cell crisis. *Eur J Haematol*, 61: 302-5 (1998).
191. Goncalves M S, Queiroz I L, Cardoso S A, Zanetti A, Strapazoni A C, Adorno E, Albuquerque A, Sant'Ana A, dos Reis M G, Barral A, Barral Netto M. Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res*, 34: 1309-13 (2001).
192. Akinola N O, Stevens S M, Franklin I M, Nash G B, Stuart J. Subclinical ischaemic episodes during the steady state of sickle cell anaemia. *J Clin Pathol*, 45: 902-6 (1992).
193. Bargoma E M, Mitsuyoshi J K, Larkin S K, Styles L A, Kuypers F A, Test S T. Serum C-reactive protein parallels secretory phospholipase A2 in sickle cell disease patients with vasoocclusive crisis or acute chest syndrome. *Blood*, 105: 3384-5 (2005).
194. Mohammed F A, Mahdi N, Sater M A, Al-Ola K, Almawi W Y. The relation of C-reactive protein to vasoocclusive crisis in children with sickle cell disease. *Blood Cells Mol Dis*, 45: 293-6 (2010).
195. Makis A C, Hatzimichael E C, Stebbing J, Bourantas K L. C-reactive protein and vascular cell adhesion molecule-1 as markers of severity in sickle cell disease. *Arch Intern Med*, 166: 366-8 (2006).
196. van Beem R T, Nur E, Zwaginga J J, Landburg P P, van Beers E J, Duits A J, Brandjes D P, Lommerse I, de Boer H C, van der Schoot C E, Schnog J J, Biemond B J. Elevated endothelial progenitor cells during painful sickle cell crisis. *Exp Hematol*, 37: 1054-9 (2009).
197. Graido-Gonzalez E, Doherty J C, Bergreen E W, Organ G, Telfer M, McMillen M A. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. *Blood*, 92: 2551-5 (1998).
198. Shephard R, Gannon G, Hay J, Shek P. Adhesion molecule expression in acute and chronic exercise. *Crit Rev Immunol*, 20: 245-66 (2000).

199. Beekhuizen H, van Furth R. Monocyte adherence to human vascular endothelium. *J Leukoc Biol*, 54: 363-78 (1993).
200. Elangbam C S, Qualls C W, Jr., Dahlgren R R. Cell adhesion molecules--update. *Vet Pathol*, 34: 61-73 (1997).
201. Belcher J, Marker P, Weber J, Hebbel R, Vercellotti G. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood*, 96: 2451-9 (2000).
202. Aslan M, Freeman B A. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radic Biol Med*, 43: 1469-83 (2007).
203. Shiu Y, Udden M, McIntire L. Perfusion with sickle erythrocytes up-regulates ICAM-1 and VCAM-1 gene expression in cultured human endothelial cells. *Blood*, 95: 3232-41 (2000).
204. Gee B E, Platt O S. Sickle reticulocytes adhere to VCAM-1. *Blood*, 85: 268-74 (1995).
205. Yang J, Furie B C, Furie B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost.*, 81: 1-7 (1999).
206. Woollard K J. Soluble bio-markers in vascular disease: much more than gauges of disease? *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 32: 233-40 (2005).
207. Sfrikakis P P, Tsokos G C. Clinical use of the measurement of soluble cell adhesion molecules in patients with autoimmune rheumatic diseases. *Clin Diagn Lab Immunol*, 4: 241-6 (1997).
208. van Kilsdonk J W J, van Kempen L C L T, van Muijen G N P, Ruiter D J, Swart G W M. Soluble adhesion molecules in human cancers: Sources and fates. *Eur J Cell Biol*, 89: 415-27 (2010).
209. Blann A, Seigneur M. Soluble markers of endothelial cell function. *Clin Hemorheol Microcirc*, 17: 3-11 (1997).
210. Blann A D, Lip G Y. Cell adhesion molecules in cardiovascular disease and its risk factors--what can soluble levels tell us? *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 1745-7 (2000).
211. Meydani M. Soluble adhesion molecules: surrogate markers of cardiovascular disease? *Nutr Rev*, 61: 63-8 (2003).
212. Leeuwenberg J F, Smeets E F, Neefjes J J, Shaffer M A, Cinek T, Jeunhomme T M, Ahern T J, Buurman W A. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology*, 77: 543-9 (1992).
213. Gamble J R, Skinner M P, Berndt M C, Vadas M A. Prevention of activated neutrophil adhesion to endothelium by soluble adhesion protein GMP140. *Science*, 249: 414-7 (1990).
214. Michelson A D, Barnard M R, Hechtman H B, MacGregor H, Connolly R J, Loscalzo J, Valeri C R. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 11877-82 (1996).
215. André P, Hartwell D, Hrachovinová I, Saffaripour S, Wagner D D. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 13835-40 (2000).
216. Sugihara K, Sugihara T, Mohandas N, Hebbel R P. Thrombospondin mediates adherence of CD36+ sickle reticulocytes to endothelial cells. *Blood*, 80: 2634-42 (1992).
217. Browne P V, Hebbel R P. CD36-positive stress reticulocytosis in sickle cell anemia. *J Lab Clin Med*, 127: 340-7 (1996).
218. Maier-Redelsperger M, Flahault A, Neonato M G, Girot R, Labie D. Automated analysis of mature red blood cells and reticulocytes in SS and SC disease. *Blood Cells Mol Dis*, 33: 15-24 (2004).
219. Cartron J P, Elion J. Erythroid adhesion molecules in sickle cell disease: Effect of hydroxyurea. *Transfus Clin Biol*, 15: 39-50 (2008).
220. Kaul D K, Tsai H M, Liu X D, Nakada M T, Nagel R L, Collier B S. Monoclonal antibodies to alphaVbeta3 (7E3 and LM609) inhibit sickle red blood cell-endothelium interactions induced by platelet-activating factor. *Blood*, 95: 368-74 (2000).
221. Brittain J E, Parise L V. The alpha4beta1 integrin in sickle cell disease. *Transfus Clin Biol*, 15: 19-22 (2008).
222. Luty G A, Taomoto M, Cao J, McLeod D S, Vanderslice P, McIntyre B W, Fabry M E, Nagel R L. Inhibition of TNF-alpha-induced sickle RBC retention in retina by a VLA-4 antagonist. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42: 1349-55 (2001).



223. Trinh-Trang-Tan M M, Vilela-Lamego C, Picot J, Wautier M P, Cartron J P. Intercellular adhesion molecule-4 and CD36 are implicated in the abnormal adhesiveness of sickle cell SAD mouse erythrocytes to endothelium. *Haematologica*, 95: 730-7 (2010).
224. Brittain J E, Han J, Ataga K I, Orringer E P, Parise L V. Mechanism of CD47-induced alpha4beta1 integrin activation and adhesion in sickle reticulocytes. *J Biol Chem*, 279: 42393-402 (2004).
225. El Nemer W, Gauthier E, Wautier M P, Rahuel C, Gane P, Galactéros F, Wautier J L, Cartron J P, Colin Y, Le Van Kim C. Role of Lu/BCAM in abnormal adhesion of sickle red blood cells to vascular endothelium. *Transfus Clin Biol*, 15: 29-33 (2008).
226. Browne P V, Mosher D F, Steinberg M H, Hebbel R P. Disturbance of plasma and platelet thrombospondin levels in sickle cell disease. *Am J Hematol*, 51: 296-301 (1996).
227. Kaul D K. Sickle red cell adhesion: many issues and some answers. *Transfus Clin Biol*, 15: 51-5 (2008).
228. Hebbel R P. Adhesion of sickle red cells to endothelium: myths and future directions. *Transfus Clin Biol*, 15: 14-8 (2008).
229. Zennadi R, Hines P C, De Castro L M, Cartron J-P, Parise L V, Telen M J. Epinephrine acts through erythroid signaling pathways to activate sickle cell adhesion to endothelium via LW-alpha v beta 3 interactions. *Blood*, 104: 3774-81 (2004).
230. Zennadi R, Moeller B J, Whalen E J, Batchvarova M, Xu K, Shan S, Delahunty M, Dewhirst M W, Telen M J. Epinephrine-induced activation of LW-mediated sickle cell adhesion and vaso-occlusion in vivo. *Blood*, 110: 2708-17 (2007).
231. Hebbel R P, Boogaerts M A, Koresawa S, Jacob H S, Eaton J W, Steinberg M H. Erythrocyte adherence to endothelium as a determinant of vasocclusive severity in sickle cell disease. *Trans Assoc Am Physicians*, 93: 94-9 (1980).
232. Kunz Mathews M, McLeod D S, Merges C, Cao J, Luty G A. Neutrophils and leucocyte adhesion molecules in sickle cell retinopathy. *Br J Ophthalmol*, 86: 684-90 (2002).
233. Kalambur V S, Mahaseth H, Bischof J C, Kielbik M C, Welch T E, Vilbäck A, Swanlund D J, Hebbel R P, Belcher J D, Vercellotti G M. Microvascular blood flow and stasis in transgenic sickle mice: utility of a dorsal skin fold chamber for intravital microscopy. *Am J Hematol*, 77: 117-25 (2004).
234. Platt O S. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. *J Clin Invest*, 106: 337-8 (2000).
235. Lipowsky H H, Chien S. Role of leukocyte-endothelium adhesion in affecting recovery from ischemic episodes. *Ann N Y Acad Sci*, 565: 308-15 (1989).
236. Okpala I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease - a red cell disorder. *Blood Rev*, 18: 65-73 (2004).
237. Kaul D K, Liu X-D, Choong S, Belcher J D, Vercellotti G M, Hebbel R P. Anti-inflammatory therapy ameliorates leukocyte adhesion and microvascular flow abnormalities in transgenic sickle mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H293-301 (2004).
238. Sultana C, Shen Y, Rattan V, Johnson C, Kalra V K. Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in the presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress leading to transendothelial migration of monocytes. *Blood*, 92: 3924-35 (1998).
239. Chang J, Shi P A, Chiang E Y, Frenette P S. Intravenous immunoglobulins reverse acute vaso-occlusive crises in sickle cell mice through rapid inhibition of neutrophil adhesion. *Blood*, 111: 915-23 (2008).
240. Solovey A, Solovey A, Harkness J, Hebbel R. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. *Blood*, 97: 1937-41 (2001).
241. Finnegan E M, Turhan A, Golan D E, Barabino G A. Adherent leukocytes capture sickle erythrocytes in an in vitro flow model of vaso-occlusion. *Am J Hematol*, 82: 266-75 (2007).
242. Fasola F, Adedapo K, Anetor J, Kuti M. Total antioxidants status and some hematological values in sickle cell disease patients in steady state. *J Natl Med Assoc*, 99: 891-4 (2007).
243. Zennadi R, Chien A, Xu K, Batchvarova M, Telen M J. Sickle red cells induce adhesion of lymphocytes and monocytes to endothelium. *Blood*, 112: 3474-83 (2008).
244. Katayama Y, Hidalgo A, Chang J, Peired A, Frenette P S. CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *J Exp Med*, 201: 1183-9 (2005).

245. Turhan A, Weiss L A, Mohandas N, Collier B S, Frenette P S. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 3047-51 (2002).
246. Hofstra T C, Kalra V K, Meiselman H J, Coates T D. Sickle erythrocytes adhere to polymorphonuclear neutrophils and activate the neutrophil respiratory burst. *Blood*, 87: 4440-7 (1996).
247. Chaar V, Picot J, Renaud O, Bartolucci P, Nzouakou R, Bachir D, Galactéros F, Colin Y, Le Van Kim C, El Nemer W. Aggregation of mononuclear and red blood cells through an  $\alpha_4\beta_1$ -Lu/basal cell adhesion molecule interaction in sickle cell disease. *Haematologica*, 95: 1841-8 (2010).
248. Brittain J E, Knoll C M, Ataga K I, Orringer E P, Parise L V. Fibronectin bridges monocytes and reticulocytes via integrin  $\alpha_4\beta_1$ . *Br J Haematol*, 141: 872-81 (2008).
249. Kato G, Martyr S, Blackwelder W, Nichols J, Coles W, Hunter L, Brennan M, Hazen S, Gladwin M. Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *Br J Haematol*, 130: 943-53 (2005).
250. Sakhalkar V S, Rao S P, Weedon J, Miller S T. Elevated plasma sVCAM-1 levels in children with sickle cell disease: impact of chronic transfusion therapy. *Am J Hematol*, 76: 57-60 (2004).
251. Duits A J, Rojer R A, van Endt T, MacGillavry M R, ten Cate H, Brandjes D P M, Schnog J B. Erythropoiesis and serum sVCAM-1 levels in adults with sickle cell disease. *Ann Hematol*, 82: 171-4 (2003).
252. Duits A, Rodriguez T, Schnog J. Serum levels of angiogenic factors indicate a pro-angiogenic state in adults with sickle cell disease. *Br J Haematol*, 134: 116-9 (2006).
253. Duits A, Pieters R, Saleh A, van R E, Katerberg H, Berend K, Rojer R. Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. *Clin Immunol Immunopathol*, 81: 96-8 (1996).
254. Conran N, Fattori A, Saad S T O, Costa F F. Increased levels of soluble ICAM-1 in the plasma of sickle cell patients are reversed by hydroxyurea. *Am J Hematol*, 76: 343-7 (2004).
255. Ataga K I, Moore C G, Hillery C A, Jones S, Whinna H C, Strayhorn D, Sohler C, Hinderliter A, Parise L V, Orringer E P. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. *Haematologica*, 93: 20-6 (2008).
256. Stuart M J, Setty B N. Sickle cell acute chest syndrome: pathogenesis and rationale for treatment. *Blood*, 94: 1555-60 (1999).
257. 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, 3rd. Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease. *Circulation*, 107: 271-8 (2003).
258. Siegel-Axel D I, Gawaz M. Platelets and endothelial cells. *Semin Thromb Hemost*, 33: 128-35 (2007).
259. Ruggeri Z M. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res*, 120 S5-9 (2007).
260. Ruggeri Z M, Ruggeri Z M. Platelet and von Willebrand factor interactions at the vessel wall. *Hamostaseologie*, 24: 1-11 (2004).
261. Green D. Coagulation cascade. *Hemodial Int*, 10: S2-4 (2006).
262. Hoffman M, Meng Z H, Roberts H R, Monroe D M. Rethinking the coagulation cascade. *Jpn J Thromb Hemost*, 16: 70-81 (2005).
263. Monroe D M, Hoffman M, Roberts H R. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22: 1381-9 (2002).
264. Owens A P, 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res*, 108: 1284-97 (2011).
265. Borensztajn K, Spek C A. Blood coagulation factor Xa as an emerging drug target. *Expert Opin Ther Targets*, 15: 341-9 (2011).
266. Oliver J J, Webb D J, Newby D E. Stimulated tissue plasminogen activator release as a marker of endothelial function in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25: 2470-9 (2005).
267. Nesheim M. Thrombin and fibrinolysis. *Chest*, 124: 33S-9S (2003).

268. Baker D C, Brassard J. Review of continuing education course on hemostasis. *Toxicol Pathol*, 39: 281-8 (2011).
269. De Franceschi L, Cappellini M D, Olivieri O. Thrombosis and sickle cell disease. *Semin Thromb Hemost*, 37: 226-36 (2011).
270. Hebbel R P. Thrombogenesis or thrombogenic risk? *J Lab Clin Med*, 137: 381-2 (2001).
271. Setty B N, Rao A K, Stuart M J. Thrombophilia in sickle cell disease: the red cell connection. *Blood*, 98: 3228-33 (2001).
272. Shet A S, Aras O, Gupta K, Hass M J, Rausch D J, Saba N, Koopmeiners L, Key N S, Hebbel R P. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*, 102: 2678-83 (2003).
273. Tomer A, Harker L A, Kasey S, Eckman J R. Thrombogenesis in sickle cell disease. *J Lab Clin Med*, 137: 398-407 (2001).
274. Helley D, Girot R, Guillin M C, Bezeaud A. Sickle cell disease: relation between procoagulant activity of red blood cells from different phenotypes and in vivo blood coagulation activation. *Br J Haematol*, 99: 268-72 (1997).
275. van Beers E J, Schaap M C L, Berckmans R J, Nieuwland R, Sturk A, van Doormaal F F, Meijers J C M, Biemond B J. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica*, 94: 1513-9 (2009).
276. Solovey A, Gui L, Key N S, Hebbel R P. Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. *J Clin Invest*, 101: 1899-904 (1998).
277. Adedeji M O, Cespedes J, Allen K, Subramony C, Hughson M D. Pulmonary thrombotic arteriopathy in patients with sickle cell disease. *Arch Pathol Lab Med*, 125: 1436-41 (2001).
278. Tam D A. Protein C and protein S activity in sickle cell disease and stroke. *J Child Neurol*, 12: 19-21 (1997).
279. Kellogg D L, Jr. In vivo mechanisms of cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans during thermoregulatory challenges. *J Appl Physiol*, 100: 1709-18 (2006).
280. Clifford P S, Buckwalter J B, Hamann J J. Attenuated sympathetic vasoconstriction in contracting muscles: just say NO. *J Physiol*, 540: 2 (2002).
281. Buckwalter J B, Clifford P S. The paradox of sympathetic vasoconstriction in exercising skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev*, 29: 159-63 (2001).
282. Kaufmann P, Mandinov L, Hess O M. Coronary stenosis vasoconstriction: impact on myocardial ischaemia. *Eur Heart J*, 18: 1853-9 (1997).
283. Jin X, Otonashi-Satoh Y, Zamami Y, Koyama T, Sun P, Kitamura Y, Kawasaki H. Endothelial modulation of agonist-induced vasoconstriction in mesenteric microcirculation. *Yakugaku Zasshi*, 130: 723-8 (2010).
284. Gutstein W H, Pérez C A. Contribution of vasoconstriction to the origin of atherosclerosis: a conceptual study. *Trends Cardiovasc Med*, 14: 257-61 (2004).
285. De Artinano A A, Gonzalez V L. Endothelial dysfunction and hypertensive vasoconstriction. *Pharmacol Res*, 40: 113-24 (1999).
286. Woodman O L. Modulation of vasoconstriction by endothelium-derived nitric oxide: the influence of vascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 22: 585-93 (1995).
287. Thorin E, Webb D J. Endothelium-derived endothelin-1. *Pflugers Arch*, 459: 951-8 (2010).
288. Piechota A, Polanczyk A, Goraca A. Role of endothelin-1 receptor blockers on hemodynamic parameters and oxidative stress. *Pharmacol Rep*, 62: 28-34 (2010).
289. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332: 411-5 (1988).
290. Krämer B K, Ittner K P, Beyer M E, Hoffmeister H M, Riegger G A. Circulatory and myocardial effects of endothelin. *J Mol Med (Berl)*, 75: 886-90 (1997).
291. Comellas A P, Briva A. Role of endothelin-1 in acute lung injury. *Transl Res*, 153: 263-71 (2009).
292. Stow L R, Jacobs M E, Wingo C S, Cain B D. Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J*, 25: 16-28 (2011).

293. Fagan K A,McMurtry I F,Rodman D M. Role of endothelin-1 in lung disease. *Respir Res*, 2: 90-101 (2001).
294. Yoshida M,Suzuki A,Itoh T. Mechanisms of vasoconstriction induced by endothelin-1 in smooth muscle of rabbit mesenteric artery. *J Physiol*, 477: 253-65 (1994).
295. Matsuura T,Yukimura T,Kim S,Miura K,Iwao H. Selective blockade of endothelin receptor subtypes on systemic and renal vascular responses to endothelin-1 and IRL1620, a selective endothelin ETB-receptor agonist, in anesthetized rats. *Jpn J Pharmacol*, 71: 213-22 (1996).
296. Kurihara Y,Kurihara H,Maemura K,Kuwaki T,Kumada M,Yazaki Y. Impaired development of the thyroid and thymus in endothelin-1 knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol*, 26: S13-6 (1995).
297. Masaki T,Kimura S,Yanagisawa M,Goto K. Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. Implications for vascular function. *Circulation*, 84: 1457-68 (1991).
298. Akinsheye I,Klings E S. Sick cell anemia and vascular dysfunction: the nitric oxide connection. *J Cell Physiol*, 224: 620-5 (2010).
299. Gladwin M T,Crawford J H,Patel R P. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic Biol Med*, 36: 707-17 (2004).
300. Loscalzo J. Endothelial injury, vasoconstriction, and its prevention. *Tex Heart Inst J*, 22: 180-4 (1995).
301. Pluta R M. New regulatory, signaling pathways, and sources of nitric oxide. *Acta Neurochir Suppl*, 110: 7-12 (2011).
302. Alonso D,Radomski M W. Nitric Oxide, Platelet Function, Myocardial Infarction and Reperfusion Therapies. *Heart Fail Rev*, 8: 47-54 (2003).
303. Kubes P,Suzuki M,Granger D N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 4651-5 (1991).
304. Kobayashi Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J Leukoc Biol*, 88: 1157-62 (2010).
305. Ignarro L J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol*, 53: 503-14 (2002).
306. Fleming I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch*, 459: 793-806 (2010).
307. Suhr F,Porten S,Hertrich T,Brixius K,Schmidt A,Platen P,Bloch W. Intensive exercise induces changes of endothelial nitric oxide synthase pattern in human erythrocytes. *Nitric Oxide*, 20: 95-103 (2009).
308. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*, 75: 639-53 (2004).
309. Huet O,Dupic L,Harrois A,Duranteau J. Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. *Front Biosci*, 16: 1986-95 (2011).
310. Crawford J H,Isbell T S,Huang Z,Shiva S,Chacko B K,Schechter A N,Darley-Usmar V M,Kerby J D,Lang J D, Jr.,Kraus D,Ho C,Gladwin M T,Patel R P. Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. *Blood*, 107: 566-74 (2006).
311. Gladwin M T,Lancaster J R, Jr.,Freeman B A,Schechter A N. Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat Med*, 9: 496-500 (2003).
312. Kleinbongard P,Schulz R,Rassaf T,Lauer T,Dejam A,Jax T,Kumara I,Gharini P,Kabanova S,Ozüyaman B,Schnürch H-G,Gödecke A,Weber A-A,Robenek M,Robenek H,Bloch W,Rösen P,Kelm M. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood*, 107: 2943-51 (2006).
313. Chen L Y,Mehta J L. Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function. *J Cardiovasc Pharmacol*, 32: 57-61 (1998).
314. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82: 47-95 (2002).
315. Elahi M M,Kong Y X,Matata B M. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2: 259-69 (2009).
316. Avery S V. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J*, 434: 201-10 (2011).
317. Chirico E N,Pialoux V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life*, 64: 72-80 (2012).



- 318. Urso M L,Clarkson P M.** Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189: 41-54 (2003).
- 319. Mohazzab K M,Kaminski P M,Wolin M S.** NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Pathol*, 266: H2568-72 (1994).
- 320. Taniyama Y,Griendling K K.** Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*, 42: 1075-81 (2003).
- 321. Syeda F,Tullis E,Slutsky A S,Zhang H.** Human neutrophil peptides upregulate expression of COX-2 and endothelin-1 by inducing oxidative stress. *Am J Physiol heart Circ Physiol*, 294: H2769-74 (2008).
- 322. Dammanahalli K J,Sun Z.** Endothelins and NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 35: 2-6 (2008).
- 323. Werdehoff S G,Moore R B,Hoff C J,Fillingim E,Hackman A M.** Elevated plasma endothelin-1 levels in sickle cell anemia: relationships to oxygen saturation and left ventricular hypertrophy. *Am J Hematol*, 58: 195-9 (1998).
- 324. Rybicki A C,Benjamin L J.** Increased levels of endothelin-1 in plasma of sickle cell anemia patients. *Blood*, 92: 2594-6 (1998).
- 325. Lapoum roulie C,Benkerrou M,Odi vre M H,Ducrocq R,Brun M,Elion J.** Decreased plasma endothelin-1 levels in children with sickle cell disease treated with hydroxyurea. *Haematologica*, 90: 401-3 (2005).
- 326. Hammerman S I,Kourembanas S,Conca T J,Tucci M,Brauer M,Farber H W.** Endothelin-1 production during the acute chest syndrome in sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 156: 280-5 (1997).
- 327. Ergul S,Brunson C Y,Hutchinson J,Tawfik A,Kutlar A,Webb R C,Ergul A.** Vasoactive factors in sickle cell disease: in vitro evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction. *Am J Hematol*, 76: 245-51 (2004).
- 328. Phelan M,Perrine S P,Brauer M,Faller D V.** Sickle erythrocytes, after sickling, regulate the expression of the endothelin-1 gene and protein in human endothelial cells in culture. *J Clin Invest*, 96: 1145-51 (1995).
- 329. Shiu Y-T,McIntire L V,Udden M M.** Sickle erythrocytes increase prostacyclin and endothelin-1 production by cultured human endothelial cells under flow conditions. *Eur J haematol*, 68: 163-9 (2002).
- 330. Perelman N,Selvaraj S K,Batra S,Luck L R,Erdreich-Epstein A,Coates T D,Kalra V K,Malik P.** Placenta growth factor activates monocytes and correlates with sickle cell disease severity. *Blood*, 102: 1506-14 (2003).
- 331. Patel N,Gonsalves C S,Malik P,Kalra V K.** Placenta growth factor augments endothelin-1 and endothelin-B receptor expression via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Blood*, 112: 856 -65 (2008).
- 332. L scher T F,Yang Z,Tschudi M,von Segesser L,Stulz P,Boulanger C,Siebenmann R,Turina M,B hler F R.** Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ Res*, 66: 1088-94 (1990).
- 333. Boulanger C,L scher T F.** Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*, 85: 587-90 (1990).
- 334. Kaul D K,Liu X D,Fabry M E,Nagel R L.** Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in transgenic sickle mouse. *Am J Physiol heart Circ Physiol*, 278: H1799-806 (2000).
- 335. Kleinbongard P,Dejam A,Lauer T,Jax T,Kerber S,Gharini P,Balzer J,Zotz R B,Scharf R E,Willers R,Schechter A N,Feelisch M,Kelm M.** Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic Biol Med*, 40: 295-302 (2006).
- 336. Rassaf T,Heiss C,Hendgen-Cotta U,Balzer J,Matern S,Kleinbongard P,Lee A,Lauer T,Kelm M.** Plasma nitrite reserve and endothelial function in the human forearm circulation. *Free Radic Biol Med*, 41: 295-301 (2006).
- 337. Morris C R,Kuypers F A,Larkin S,Vichinsky E P,Styles L A.** Patterns of arginine and nitric oxide in patients with sickle cell disease with vaso-occlusive crisis and acute chest syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*, 22: 515-20 (2000).

- 338. Kaul D K,Zhang X,Dasgupta T,Fabry M E.** Arginine therapy of transgenic-knockout sickle mice improves microvascular function by reducing non-nitric oxide vasodilators, hemolysis, and oxidative stress. *Am J Physiol heart Circ Physiol*, 295: H39-47 (2008).
- 339. Dasgupta T,Fabry M E,Kaul D K.** Antisickling property of fetal hemoglobin enhances nitric oxide bioavailability and ameliorates organ oxidative stress in transgenic-knockout sickle mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 298: R394 -R402 (2010).
- 340. Lopez B L,Barnett J,Ballas S K,Christopher T A,Davis-Moon L,Ma X.** Nitric oxide metabolite levels in acute vaso-occlusive sickle-cell crisis. *Acad Emerg Med*, 3: 1098-103 (1996).
- 341. Morris C R,Kato G J,Poljakovic M,Wang X,Blackwelder W C,Sachdev V,Hazen S L,Vichinsky E P,Morris S M, Jr.,Gladwin M T.** Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA*, 294: 81-90 (2005).
- 342. Reiter C D,Wang X,Tanus-Santos J E,Hogg N,Cannon R O, 3rd,Schechter A N,Gladwin M T.** Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med*, 8: 1383-9 (2002).
- 343. 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.** Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 15215-20 (2001).
- 344. Pritchard K A, Jr.,Ou J,Ou Z,Shi Y,Franciosi J P,Signorino P,Kaul S,Ackland-Berglund C,Witte K,Holzhauser S,Mohandas N,Guice K S,Oldham K T,Hillery C A.** Hypoxia-induced acute lung injury in murine models of sickle cell disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286: L705-14 (2004).
- 345. Belhassen L,Pelle G,Sedjame S,Bachir D,Carville C,Bucherer C,Lacombe C,Galacteros F,Adnot S.** Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilation. *Blood*, 97: 1584-9 (2001).
- 346. Weiner D L,Hibberd P L,Betit P,Cooper A B,Botelho C A,Brugnara C.** Preliminary assessment of inhaled nitric oxide for acute vaso-occlusive crisis in pediatric patients with sickle cell disease. *JAMA*, 289: 1136-42 (2003).
- 347. Kaul D K,Liu X-d,Zhang X,Ma L,Hsia C J C,Nagel R L.** Inhibition of sickle red cell adhesion and vasoocclusion in the microcirculation by antioxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 291: H167 - H75 (2006).
- 348. Emokpae M A,Uadia P O,Gadzama A A.** Correlation of oxidative stress and inflammatory markers with the severity of sickle cell nephropathy. *Ann Afr Med*, 9: 141-6 (2010).
- 349. Rusanova I,Escames G,Cossio G,De Borace R G,Moreno B,Chahboune M,López L C,Díez T,Acuña-Castroviejo D.** Oxidative Stress Status, Clinical Outcome, and  $\beta$ -Globin Gene Cluster haplotypes in Sickle Cell Pediatric Patients. *Eur J Haematol*, 85: 529-37 (2010).
- 350. Nath K A,Grande J P,Haggard J J,Croatt A J,Katusic Z S,Solovey A,Hebbel R P.** Oxidative stress and induction of heme oxygenase-1 in the kidney in sickle cell disease. *Am J Pathol*, 158: 893-903 (2001).
- 351. Das S K,Nair R C.** Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. *Br J Haematol*, 44: 87-92 (1980).
- 352. Manfredini V,Lazzaretti L L,Griebeler I H,Santin A P,Brandão V D M,Wagner S,Castro S M,Peralba M d C R,Benfato M S.** Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. *J Natl Med Assoc*, 100: 897-902 (2008).
- 353. Amer J,Ghoti H,Rachmilewitz E,Koren A,Levin C,Fibach E.** Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *Br J Haematol*, 132: 108-13 (2006).
- 354. Graça-Souza A V,Arruda M A B,de Freitas M S,Barja-Fidalgo C,Oliveira P L.** Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood*, 99: 4160-5 (2002).
- 355. Hebbel R P,Morgan W T,Eaton J W,Hedlund B E.** Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 237-41 (1988).
- 356. Wood K C,Hsu L L,Gladwin M T.** Sickle cell disease vasculopathy: A state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med*, 44: 1506-28 (2008).

357. Ataga K I, Smith W R, De Castro L M, Swerdlow P, Sauntharajah Y, Castro O, Vichinsky E, Kutlar A, Orringer E P, Rigdon G C, Stocker J W. Efficacy and safety of the Gardos channel blocker, senicapoc (ICA-17043), in patients with sickle cell anemia. *Blood*, 111: 3991-7 (2008).
358. Gourdin M J, Bree B, De Kock M. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *Eur J Anaesthesiol*, 26: 537-47 (2009).
359. Frank R D, Schabbauer G, Holscher T, Sato Y, Tencati M, Pawlinski R, Mackman N. The synthetic pentasaccharide fondaparinux reduces coagulation, inflammation and neutrophil accumulation in kidney ischemia-reperfusion injury. *J Thromb Haemost*, 3: 531-40 (2005).
360. Ding R, Han J, Tian Y, Guo R, Ma X. Sphingosine-1-Phosphate Attenuates Lung Injury Induced by Intestinal Ischemia/Reperfusion in Mice: Role of Inducible Nitric-Oxide Synthase. *Inflammation*, 35: 158-66 (2012).
361. Berthonneche C, Sulpice T, Boucher F, Gouraud L, de Leiris J, O'Connor S E, Herbert J M, Janiak P. New insights into the pathological role of TNF-alpha in early cardiac dysfunction and subsequent heart failure after infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H340-50 (2004).
362. Saenz-Morales D, Conde E, Blanco-Sanchez I, Ponte B, Aguado-Fraile E, de Las Casas G, Garcia-Martos M, Alegre L, Escribese M M, Molina A, Santiuste C, Liano F, Garcia-Bermejo M L. Differential resolution of inflammation and recovery after renal ischemia-reperfusion injury in Brown Norway compared with Sprague Dawley rats. *Kidney Int*, 77: 781-93 (2010).
363. Shreeniwas R, Koga S, Karakurum M, Pinsky D, Kaiser E, Brett J, Wolitzky B A, Norton C, Plocinski J, Benjamin W, et al. Hypoxia-mediated induction of endothelial cell interleukin-1 alpha. An autocrine mechanism promoting expression of leukocyte adhesion molecules on the vessel surface. *J Clin Invest*, 90: 2333-9 (1992).
364. Zhang C, Xu X, Potter B J, Wang W, Kuo L, Michael L, Bagby G J, Chilian W M. TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26: 475-80 (2006).
365. Abdallah D M, Nassar N N, Abd-El-Salam R M. Glibenclamide ameliorates ischemia-reperfusion injury via modulating oxidative stress and inflammatory mediators in the rat hippocampus. *Brain Res*, 1385: 257-62 (2011).
366. Tian X F, Yao J H, Li Y H, Gao H F, Wang Z Z, Yang C M, Zheng S S. Protective effect of pyrrolidine dithiocarbamate on liver injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 5: 90-5 (2006).
367. Yao X M, Chen H, Li Y. Protective effect of bicyclol on liver injury induced by hepatic warm ischemia/reperfusion in rats. *Hepatol Res*, 39: 833-42 (2009).
368. Wu C, Wang P, Rao J, Wang Z, Zhang C, Lu L, Zhang F. Triptolide alleviates hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating oxidative stress and inhibiting NF-kappaB activity in mice. *J Surg Res*, 166: e205-13 (2011).
369. Kara I, Nurten A, Aydin M, Ozkok E, Ozen I, Ozerman B, Tuna S, Karamursel S. Ischemia/reperfusion in rat: antioxidative effects of enoant on EEG, oxidative stress and inflammation. *Brain Inj*, 25: 113-26 (2011).
370. Nossuli T O, Frangogiannis N G, Knuefermann P, Lakshminarayanan V, Dewald O, Evans A J, Peschon J, Mann D L, Michael L H, Entman M L. Brief murine myocardial I/R induces chemokines in a TNF-alpha-independent manner: role of oxygen radicals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281: H2549-58. (2001).
371. Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *J Am Coll Cardiol*, 39: 1229-35 (2002).
372. Kurrelmeyer K M, Michael L H, Baumgarten G, Taffet G E, Peschon J J, Sivasubramanian N, Entman M L, Mann D L. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 5456-61. (2000).

- 373. Briaud S A, Ding Z M, Michael L H, Entman M L, Daniel S, Ballantyne C M.** Leukocyte trafficking and myocardial reperfusion injury in ICAM-1/P-selectin-knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280: H60-7 (2001).
- 374. Kim C D, Kim Y K, Lee S H, Hong K W.** Rebamipide inhibits neutrophil adhesion to hypoxia/reoxygenation-stimulated endothelial cells via nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther*, 294: 864-9 (2000).
- 375. Ng C K, Deshpande S S, Irani K, Alevriadou B R.** Adhesion of flowing monocytes to hypoxia-reoxygenation-exposed endothelial cells: role of Rac1, ROS, and VCAM-1. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283: C93-102 (2002).
- 376. Yadav S S, Howell D N, Gao W, Steeber D A, Harland R C, Clavien P A.** L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver. *Am J Physiol*, 275: G1341-52 (1998).
- 377. Yoshida N, Granger D N, Anderson D C, Rothlein R, Lane C, Kvietys P R.** Anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Am J Physiol*, 262: H1891-8 (1992).
- 378. Jones S P, Trocha S D, Strange M B, Granger D N, Kevil C G, Bullard D C, Lefer D J.** Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in a chronic murine model of myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279: H2196-201. (2000).
- 379. Palazzo A J, Jones S P, Anderson D C, Granger D N, Lefer D J.** Coronary endothelial P-selectin in pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*, 275: H1865-72. (1998).
- 380. Kakkar A K, Lefer D J.** Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. *Curr Opin Pharmacol*, 4: 154-8 (2004).
- 381. Tok A, Sener E, Albayrak A, Cetin N, Polat B, Suleyman B, Akcay F, Suleyman H.** Effect of Mirtazapine on Oxidative Stress Created in Rat Kidneys by Ischemia-Reperfusion. *Ren Fail*, 34: 103-10 (2012).
- 382. Bajory Z, Szabo A, Kiraly I, Pajor L, Messmer K.** Involvement of nitric oxide in microcirculatory reactions after ischemia-reperfusion of the rat urinary bladder. *Eur Surg Res*, 42: 28-34. (2009).
- 383. Chen H Y, Hung Y C, Lee E J, Chen T Y, Chuang I C, Wu T S.** The protective efficacy of magnolol in hind limb ischemia-reperfusion injury. *Phytomedicine*, 16: 976-81 (2009).
- 384. Esme H, Fidan H, Koken T, Solak O.** Effect of lung ischemia--reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues. *Eur J Cardiothorac Surg*, 29: 294-8 (2006).
- 385. Miranda L E, Capellini V K, Reis G S, Celotto A C, Carlotti C G, Jr., Evora P R.** Effects of partial liver ischemia followed by global liver reperfusion on the remote tissue expression of nitric oxide synthase: lungs and kidneys. *Transplant Proc*, 42: 1557-62 (2010).
- 386. Nagai H, Kato A, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Furukawa K, Nozawa S, Yoshitomi H, Mitsuhashi N, Takeuchi D, Suda K, Yoshioka I, Miyazaki M.** Endothelin-1 aggravates hepatic ischemia/reperfusion injury during obstructive cholestasis in bile duct ligated mice. *J Surg Res*, 162: 46-53 (2010).
- 387. Cooper D, Chitman K D, Williams M C, Granger D N.** Time-dependent platelet-vessel wall interactions induced by intestinal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284: G1027-33 (2003).
- 388. Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Axmann S, Hutter J, Messmer K, Krombach F.** Platelet adhesion mediated by fibrinogen-intercellular adhesion molecule-1 binding induces tissue injury in the postischemic liver in vivo. *Transplantation*, 74: 681-8 (2002).
- 389. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K.** Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood*, 92: 507-15 (1998).
- 390. Massberg S, Enders G, Matos F C, Tomic L I, Leiderer R, Eisenmenger S, Messmer K, Krombach F.** Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood*, 94: 3829-38 (1999).
- 391. Nishijima K, Kiryu J, Tsujikawa A, Miyamoto K, Honjo M, Tanihara H, Nonaka A, Yamashiro K, Katsuta H, Miyahara S, Honda Y, Ogura Y.** Platelets adhering to the vascular wall mediate



- postischemic leukocyte-endothelial cell interactions in retinal microcirculation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45: 977-84 (2004).
- 392. Armaganian L, Kam G, Eisenberg P R, Schechtman K B, Abendschein D R.** Role of tissue factor-mediated coagulation in ischemia/reperfusion-induced injury of Langendorff-perfused rabbit hearts. *Coron Artery Dis*, 11: 481-7 (2000).
- 393. Golino P, Ragni M, Cirillo P, Avvedimento V E, Feliciello A, Esposito N, Scognamiglio A, Trimarco B, Iaccarino G, Condorelli M, Chiariello M, Ambrosio G.** Effects of tissue factor induced by oxygen free radicals on coronary flow during reperfusion. *Nat Med*, 2: 35-40 (1996).
- 394. Kloek J J, Levi M, Heger M, van der Loos C M, Gouma D J, van Gulik T M.** Cholestasis enhances liver ischemia/reperfusion-induced coagulation activation in rats. *Hepatol Res*, 40: 204-15 (2010).
- 395. Okada Y, Copeland B R, Fitridge R, Koziol J A, del Zoppo G J.** Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*, 25: 1847-53; discussion 53-4 (1994).
- 396. Schoots I G, Levi M, Roossink E H, Bijlsma P B, van Gulik T M.** Local intravascular coagulation and fibrin deposition on intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Surgery today*, 133: 411-9 (2003).
- 397. Schoots I G, Levi M, van Vliet A K, Maas A M, Roossink E H, van Gulik T M.** Inhibition of coagulation and inflammation by activated protein C or antithrombin reduces intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Crit Care Med*, 32: 1375-83 (2004).
- 398. Kobayashi Y, Yoshimura N, Nakamura K, Yamagishi H, Oka T.** Expression of tissue factor in hepatic ischemic-reperfusion injury of the rat. *Transplantation*, 66: 708-16 (1998).
- 399. Sun Z, Wang X, Deng X, Lasso A, Soltesz V, Borjesson A, Andersson R.** Beneficial effects of lexipafant, a PAF antagonist on gut barrier dysfunction caused by intestinal ischemia and reperfusion in rats. *Dig Surg*, 17: 57-65 (2000).
- 400. Salter J W, Krieglstein C F, Issekutz A C, Granger D N.** Platelets modulate ischemia/reperfusion-induced leukocyte recruitment in the mesenteric circulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281: G1432-9 (2001).
- 401. Crack P J, Taylor J M, Flentjar N J, de Haan J, Hertzog P, Iannello R C, Kola I.** Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. *J Neurochem*, 78: 1389-99 (2001).
- 402. Hayashi T, De Velasco M A, Saitou Y, Nose K, Nishioka T, Ishii T, Uemura H.** Carvedilol protects tubular epithelial cells from ischemia-reperfusion injury by inhibiting oxidative stress. *Int J Urol*, 17: 989-95 (2010).
- 403. Kang S M, Lim S, Song H, Chang W, Lee S, Bae S M, Chung J H, Lee H, Kim H G, Yoon D H, Kim T W, Jang Y, Sung J M, Chung N S, Hwang K C.** Allopurinol modulates reactive oxygen species generation and Ca<sup>2+</sup> overload in ischemia-reperfused heart and hypoxia-reoxygenated cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol*, 535: 212-9 (2006).
- 404. Ovechkin A V, Lominadze D, Sedoris K C, Robinson T W, Tyagi S C, Roberts A M.** Lung ischemia-reperfusion injury: implications of oxidative stress and platelet-arteriolar wall interactions. *Arch Physiol Biochem*, 113: 1-12 (2007).
- 405. Polat K Y, Aydinli B, Polat O, Aydin U, Yazici P, Ozturk G, Gundogdu C, Kiziltunc A.** The protective effect of aprotinin and alpha-tocopherol on ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Transplant Proc*, 40: 63-8. (2008).
- 406. Aki H S, Fujita M, Yamashita S, Fujimoto K, Kumagai K, Tsuruta R, Kasaoka S, Aoki T, Nanba M, Murata H, Yuasa M, Maruyama I, Maekawa T.** Elevation of jugular venous superoxide anion radical is associated with early inflammation, oxidative stress, and endothelial injury in forebrain ischemia-reperfusion rats. *Brain Res*, 1292: 180-90 (2009).
- 407. Fujita M, Tsuruta R, Kaneko T, Otsuka Y, Kutsuna S, Izumi T, Aoki T, Shitara M, Kasaoka S, Maruyama I, Yuasa M, Maekawa T.** Hyperoxia suppresses excessive superoxide anion radical generation in blood, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in forebrain ischemia/reperfusion rats: laboratory study. *Shock*, 34: 299-305 (2010).

408. Cai F, Li C, Wu J, Min Q, Ouyang C, Zheng M, Ma S, Yu W, Lin F. Modulation of the oxidative stress and nuclear factor kappaB activation by theaflavin 3,3'-gallate in the rats exposed to cerebral ischemia-reperfusion. *Folia Biol*, 53: 164-72 (2007).
409. Gedik E, Girgin S, Ozturk H, Obay B D, Buyukbayram H. Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol*, 14: 7101-6 (2008).
410. Lassnigg A, Punz A, Barker R, Keznickl P, Manhart N, Roth E, Hiesmayr M. Influence of intravenous vitamin E supplementation in cardiac surgery on oxidative stress: a double-blinded, randomized, controlled study. *Br J Anaesth*, 90: 148-54 (2003).
411. Yucel A F, Kanter M, Pergel A, Erboga M, Guzel A. The role of curcumin on intestinal oxidative stress, cell proliferation and apoptosis after ischemia/reperfusion injury in rats. *J Mol Histol*, 42: 579-87 (2011).
412. Bertuglia S. Intermittent hypoxia modulates nitric oxide-dependent vasodilation and capillary perfusion during ischemia-reperfusion-induced damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294: H1914-22 (2008).
413. Guven A, Uysal B, Akgul O, Cermik H, Gundogdu G, Surer I, Ozturk H, Korkmaz A. Scavenging of peroxynitrite reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Ren Fail*, 30: 747-54 (2008).
414. Kizilgun M, Poyrazoglu Y, Oztas Y, Yaman H, Cakir E, Cayci T, Akgul O E, Kurt Y G, Yaren H, Kunak Z I, Macit E, Ozkan E, Taslipinar M Y, Turker T, Ozcan A. Beneficial effects of N-acetylcysteine and ebselen on renal ischemia/reperfusion injury. *Ren Fail*, 33: 512-7 (2011).
415. Ofluoglu E, Kerem M, Pasaoglu H, Turkozkan N, Seven I, Bedirli A, Utku Yilmaz T. Delayed energy protection of ischemic preconditioning on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Eur Surg Res*, 38: 114-21 (2006).
416. Tunc T, Uysal B, Atabek C, Kesik V, Caliskan B, Oztas E, Ersoz N, Oter S, Guven A. Erdosteine and ebselen as useful agents in intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*, 155: 210-6 (2009).
417. Yanarates O, Guven A, Sizlan A, Uysal B, Akgul O, Atim A, Ozcan A, Korkmaz A, Kurt E. Ameliorative effects of proanthocyanidin on renal ischemia/reperfusion injury. *Ren Fail*, 30: 931-8 (2008).
418. Besse S, Bulteau A L, Boucher F, Riou B, Swynghedauw B, de Leiris J. Antioxidant treatment prevents cardiac protein oxidation after ischemia-reperfusion and improves myocardial function and coronary perfusion in senescent hearts. *J Physiol Pharmacol*, 57: 541-52 (2006).
419. Gunal O, Aktan A O, Yegen C, Kurtel H, Yalin R. Captopril prevents the oxidative damage to proteins after renal ischemia reperfusion injury: role of endothelin-1. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 56: 23-7 (1997).
420. Wang Q, Tompkins K D, Simonyi A, Korthuis R J, Sun A Y, Sun G Y. Apocynin protects against global cerebral ischemia-reperfusion-induced oxidative stress and injury in the gerbil hippocampus. *Brain Res*, 1090: 182-9 (2006).
421. Abramov A Y, Scorziello A, Duchen M R. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci*, 27: 1129-38 (2007).
422. Wu Y, Lu X, Xiang F L, Lui E M, Feng Q. North American ginseng protects the heart from ischemia and reperfusion injury via upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Pharmacol Res*, 64: 195-202 (2011).
423. Li H H, Fu X B, Sun T Z, Cai C L, Zhou G, Chen W, Sheng Z Y. Non-mitogenic acidic fibroblast growth factor reduces intestinal dysfunction induced by ischemia and reperfusion injury in rats. *J Gastroenterol Hepatol*, 22: 363-70 (2007).
424. Masuda H, Kawano K, Matsuoka Y, Yokoyama M, Koga F, Saito K, Kihara K, Azuma H. Interactions between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in response to ischaemia-reperfusion of rabbit bladder. *BJU Int*, 106: 716-22 (2010).
425. Miclescu A, Sharma H S, Martijn C, Wiklund L. Methylene blue protects the cortical blood-brain barrier against ischemia/reperfusion-induced disruptions. *Crit Care Med*, 38: 2199-206 (2010).

426. Schneider R, Meusel M, Betz B, Kersten M, Moller-Ehrlich K, Wanner C, Koepsell H, Sauvant C. Nitric oxide-induced regulation of renal organic cation transport after renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 301: F997-F1004 (2011).
427. Tripatara P, Patel N S, Webb A, Rathod K, Lecomte F M, Mazzon E, Cuzzocrea S, Yaqoob M M, Ahluwalia A, Thiemermann C. Nitrite-derived nitric oxide protects the rat kidney against ischemia/reperfusion injury in vivo: role for xanthine oxidoreductase. *J Am Soc Nephrol*, 18: 570-80 (2007).
428. Beasley T C, Bari F, Thore C, Thrikawala N, Louis T, Busija D. Cerebral ischemia/reperfusion increases endothelial nitric oxide synthase levels by an indomethacin-sensitive mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18: 88-96 (1998).
429. Milsom A B, Patel N S, Mazzon E, Tripatara P, Storey A, Mota-Filipe H, Sepodes B, Webb A J, Cuzzocrea S, Hobbs A J, Thiemermann C, Ahluwalia A. Role for endothelial nitric oxide synthase in nitrite-induced protection against renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Nitric Oxide*, 22: 141-8 (2010).
430. Tarin C, Lavin B, Gomez M, Saura M, Diez-Juan A, Zaragoza C. The extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN is a target of nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med*, 51: 387-95 (2011).
431. Trocha M, Merwid-Lad A, Szuba A, Chlebda E, Piesniewska M, Sozanski T, Szelag A. Effect of simvastatin on nitric oxide synthases (eNOS, iNOS) and arginine and its derivatives (ADMA, SDMA) in ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Pharmacol Rep*, 62: 343-51 (2010).
432. Hines I N, Harada H, Flores S, Gao B, McCord J M, Grisham M B. Endothelial nitric oxide synthase protects the post-ischemic liver: potential interactions with superoxide. *Biomed Pharmacother*, 59: 183-9 (2005).
433. Hines I N, Grisham M B. Divergent roles of superoxide and nitric oxide in liver ischemia and reperfusion injury. *J Clin Biochem Nutr*, 48: 50-6 (2011).
434. Mohammadi M T, Shid Moosavi S M, Dehghani G A. Contribution of nitric oxide synthase (NOS) activity in blood-brain barrier disruption and edema after acute ischemia/reperfusion in aortic coarctation-induced hypertensive rats. *Iran Biomed J*, 15: 22-30 (2011).
435. Gu Y, Zheng G, Xu M, Li Y, Chen X, Zhu W, Tong Y, Chung S K, Liu K J, Shen J. Caveolin-1 regulates nitric oxide-mediated matrix metalloproteinases activity and blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia and reperfusion injury. *J Neurochem*, 18: 1471-4159 (2011).
436. Saito M, Wada K, Kamisaki Y, Miyagawa I. Effect of ischemia-reperfusion on contractile function of rat urinary bladder: possible role of nitric oxide. *Life Sci*, 62: PL149-56 (1998).
437. Giedt R J, Yang C, Zweier J L, Matzavinos A, Alevisiou B R. Mitochondrial fission in endothelial cells after simulated ischemia/reperfusion: role of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*, 52: 348-56 (2012).
438. Virlos I T, Inglott F S, Williamson R C, Mathie R T. Differential expression of pulmonary nitric oxide synthase isoforms after intestinal ischemia-reperfusion. *Hepatogastroenterology*, 50: 31-6 (2003).
439. Siriussawakul A, Zaky A, Lang J D. Role of nitric oxide in hepatic ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol*, 16: 6079-86 (2010).
440. Hassan M, Kashimura H, Matsumaru K, Nakahara A, Iwata R, Hayashi T, Muto H, Tanaka N, Goto K, Fukutomi H. Gastric mucosal injury induced by local ischemia-reperfusion in rats. Role of endogenous endothelin-1 and free radical. *Dig Dis Sci*, 42: 1375-80 (1997).
441. Soda Y, el-Assal O N, Yu L, Nagasue N. Suppressed endothelin-1 production by FK506 and cyclosporin A in ischemia/reperfusion of rat small intestine. *Surgery*, 125: 23-32 (1999).
442. Jeong G Y, Chung K Y, Lee W J, Kim Y S, Sung S H. The effect of a nitric oxide donor on endogenous endothelin-1 expression in renal ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc*, 36: 1943-5 (2004).
443. Goto M, Takei Y, Kawano S, Nagano K, Tsuji S, Masuda E, Nishimura Y, Okumura S, Kashiwagi T, Fusamoto H, et al. Endothelin-1 is involved in the pathogenesis of ischemia/reperfusion liver injury by hepatic microcirculatory disturbances. *Hepatology*, 19: 675-81 (1994).



444. Kurata H, Takaoka M, Kubo Y, Katayama T, Tsutsui H, Takayama J, Matsumura Y. Nitric oxide protects against ischemic acute renal failure through the suppression of renal endothelin-1 overproduction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 44: S455-8 (2004).
445. Nakajima A, Ueda K, Takaoka M, Kurata H, Takayama J, Ohkita M, Matsumura Y. Effects of pre- and post-ischemic treatments with FK409, a nitric oxide donor, on ischemia/reperfusion-induced renal injury and endothelin-1 production in rats. *Biol Pharm Bull*, 29: 577-9 (2006).
446. Kawamura E, Yamanaka N, Okamoto E, Tomoda F, Furukawa K. Response of plasma and tissue endothelin-1 to liver ischemia and its implication in ischemia-reperfusion injury. *Hepatology*, 21: 1138-43 (1995).
447. Matsumoto T, Yamaguchi M, Kikuchi H, Nakano H, Midorikawa T, Kumada K, Takeda M. Heparin reduces serum levels of endothelin-1 and hepatic ischemia reperfusion injury in rabbits. *Surg Today*, 30: 523-5 (2000).
448. Seo K Y, Chung K Y, Kim Y S, Moon I H, Choi K J. Effect of lipo-PGE1 on ischemia-reperfusion injury and endothelin-1 concentrations after canine partial liver transplantation. *Transplant Proc*, 35: 122-5. (2003).
449. Tsuchiya Y, Suzuki S, Inaba K, Sakaguchi T, Baba S, Miwa M, Konno H, Nakamura S. Impact of endothelin-1 on microcirculatory disturbance after partial hepatectomy under ischemia/reperfusion in thioacetamide-induced cirrhotic rats. *J Surg Res*, 111: 100-8 (2003).
450. LeDoux J F, Tamareille S, Felli P R, Amirian J, Smalling R W. Left ventricular unloading with intra-aortic counter pulsation prior to reperfusion reduces myocardial release of endothelin-1 and decreases infarction size in a porcine ischemia-reperfusion model. *Catheter Cardiovasc Interv*, 72: 513-21 (2008).
451. Vago H, Soos P, Zima E, Geller L, Keltai K, Roka A, Kekesi V, Juhasz-Nagy A, Merkely B. Changes of endothelin-1 and big endothelin-1 levels and action potential duration during myocardial ischemia-reperfusion in dogs with and without ventricular fibrillation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 44: S376-9 (2004).
452. Katsuramaki T, Isobe M, Kimura H, Nagayama M, Meguro M, Nui A, Matsuno T, Ura H, Mukaiya M, Hirata K. Different changes of endothelin-1 after reperfusion in a warm ischemia/reperfusion and transplantation model in pig liver. *Transplant Proc*, 32: 2276-8 (2000).
453. Bajory Z, Hutter J, Krombach F, Messmer K. The role of endothelin-1 in ischemia-reperfusion induced acute inflammation of the bladder in rats. *J Urol*, 168: 1222-5 (2002).
454. Climent B, Fernandez N, Sanz E, Sanchez A, Monge L, Garcia-Villalon A L, Dieguez G. Enhanced response of pig coronary arteries to endothelin-1 after ischemia-reperfusion. Role of endothelin receptors, nitric oxide and prostanoids. *Eur J Pharmacol*, 524: 102-10 (2005).
455. Aslan M, Ryan T M, Townes T M, Coward L, Kirk M C, Barnes S, Alexander C B, Rosenfeld S S, Freeman B A. Nitric oxide-dependent generation of reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization. *J Biol Chem*, 278: 4194-204 (2003).
456. Field J J, Nathan D G, Linden J. Targeting iNKT cells for the treatment of sickle cell disease. *Clin Immunol*, 140: 177-83 (2011).
457. Juncos J P, Grande J P, Murali N, Croatt A J, Juncos L A, Hebbel R P, Katusic Z S, Nath K A. Anomalous renal effects of tin protoporphyrin in a murine model of sickle cell disease. *Am J Pathol*, 169: 21-31 (2006).
458. Nath K A, Grande J P, Croatt A J, Frank E, Caplice N M, Hebbel R P, Katusic Z S. Transgenic sickle mice are markedly sensitive to renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol*, 166: 963-72 (2005).
459. Wood K C, Hebbel R P, Granger D N. Endothelial cell P-selectin mediates a proinflammatory and prothrombotic phenotype in cerebral venules of sickle cell transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286: H1608-14 (2004).
460. Bank N, Kiroycheva M, Ahmed F, Anthony G M, Fabry M E, Nagel R L, Singhal P C. Peroxynitrite formation and apoptosis in transgenic sickle cell mouse kidneys. *Kidney Int*, 54: 1520-8 (1998).
461. Kollander R, Solovey A, Milbauer L C, Abdulla F, Kelm R J, Jr., Hebbel R P. Nuclear factor-kappa B (NFkappaB) component p50 in blood mononuclear cells regulates endothelial tissue factor expression

- in sickle transgenic mice: implications for the coagulopathy of sickle cell disease. *Transl Res*, 155: 170-7 (2010).
- 462. Van Praagh E,Collectif.** Physiologie du sport : Enfant et adolescent. *De Boeck*, 1er ed.: 81-84 (2007).
- 463. Chaar V,Romana M,Tripette J,Broquere C,Huisse M G,Hue O,Hardy-Dessources M D,Connes P.** Effect of strenuous physical exercise on circulating cell-derived microparticles. *Clin Hemorheol Microcirc*, 47: 15-25 (2011).
- 464. Hellsten Y,Frandsen U,Orthenblad N,Sjodin B,Richter E A.** Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. *J Physiol*, 498: 239-48 (1997).
- 465. Neubauer O,Konig D,Wagner K H.** Recovery after an Ironman triathlon: sustained inflammatory responses and muscular stress. *Eur J Appl Physiol*, 104: 417-26 (2008).
- 466. Signorelli S S,Mazzarino M C,Di Pino L,Malaponte G,Porto C,Pennisi G,Marchese G,Costa M P,Digrandi D,Celotta G,Virgilio V.** High circulating levels of cytokines (IL-6 and TNFalpha), adhesion molecules (VCAM-1 and ICAM-1) and selectins in patients with peripheral arterial disease at rest and after a treadmill test. *Vasc Med*, 8: 15-9 (2003).
- 467. von Kanel R,Hong S,Pung M A,Mills P J.** Association of blood pressure and fitness with levels of atherosclerotic risk markers pre-exercise and post-exercise. *Am J Hypertens*, 20: 670-5 (2007).
- 468. Nieman D C,Henson D A,Smith L L,Utter A C,Vinci D M,Davis J M,Kaminsky D E,Shute M.** Cytokine changes after a marathon race. *J Appl Physiol*, 91: 109-14 (2001).
- 469. Suzuki K,Peake J,Nosaka K,Okutsu M,Abbiss C R,Surriano R,Bishop D,Quod M J,Lee H,Martin D T,Laursen P B.** Changes in markers of muscle damage, inflammation and HSP70 after an Ironman Triathlon race. *Eur J Appl Physiol*, 98: 525-34 (2006).
- 470. Zaldivar F,Wang-Rodriguez J,Nemet D,Schwindt C,Galassetti P,Mills P J,Wilson L D,Cooper D M.** Constitutive pro- and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. *J Appl Physiol*, 100: 1124-33 (2006).
- 471. Drenth J P, Van Uum S H, Van Deuren M, Pesman G J, Van der Ven-Jongekrijg J, Van der Meer J W.** Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production. *J Appl Physiol*, 79: 1497-503 (1995).
- 472. Ostrowski K,Hermann C,Bangash A,Schjerling P,Nielsen J N,Pedersen B K.** A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *J Physiol*, 513: 889-94 (1998).
- 473. Sprenger H,Jacobs C,Nain M,Gressner A M,Prinz H,Wesemann W,Gemsa D.** Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running. *Clin Immunol Immunopathol*, 63: 188-95 (1992).
- 474. Mendham A E,Donges C E,Liberts E A,Duffield R.** Effects of mode and intensity on the acute exercise-induced IL-6 and CRP responses in a sedentary, overweight population. *Eur J Appl Physiol*, 111: 1035-45 (2011).
- 475. Smith L L,Anwar A,Fragen M,Rananto C,Johnson R,Holbert D.** Cytokines and cell adhesion molecules associated with high-intensity eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol*, 82: 61-7 (2000).
- 476. Nieman D C,Henson D A,McAnulty S R,McAnulty L,Swick N S,Utter A C,Vinci D M,Opiela S J,Morrow J D.** Influence of vitamin C supplementation on oxidative and immune changes after an ultramarathon. *J Appl Physiol*, 92: 1970-7 (2002).
- 477. Pledge D,Grosset J F,Onambele-Pearson G L.** Is there a morning-to-evening difference in the acute IL-6 and cortisol responses to resistance exercise? *Cytokine*, 55: 318-23 (2011).
- 478. Pedersen B K,Hoffman-Goetz L.** Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev*, 80: 1055-81 (2000).
- 479. Bruunsgaard H,Galbo H,Halkjaer-Kristensen J,Johansen T L,MacLean D A,Pedersen B K.** Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J Physiol*, 499: 833-41 (1997).
- 480. Zietkowski Z,Skiepkowski R,Tomasiak M M,Bodzenta-Lukaszyk A.** Soluble CD40 ligand and soluble P-selectin in allergic asthma patients during exercise-induced bronchoconstriction. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 18: 272-8 (2008).

- 481. Teixeira-Lemos E, Nunes S, Teixeira F, Reis F.** Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Cardiovasc Diabetol*, 10: 12 (2011).
- 482. Stewart L K, Flynn M G, Campbell W W, Craig B A, Robinson J P, Timmerman K L, McFarlin B K, Coen P M, Talbert E.** The influence of exercise training on inflammatory cytokines and C-reactive protein. *Med Sci Sports Exerc*, 39: 1714-9 (2007).
- 483. Kop W J, Weinstein A A, Deuster P A, Whittaker K S, Tracy R P.** Inflammatory markers and negative mood symptoms following exercise withdrawal. *Brain Behav Immun*, 22: 1190-6 (2008).
- 484. Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K.** Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev*, 16: 105-18 (2010).
- 485. Teixeira de Lemos E, Reis F, Baptista S, Pinto R, Sepodes B, Vala H, Rocha-Pereira P, Correia da Silva G, Teixeira N, Silva A S, Carvalho L, Teixeira F, Das U N.** Exercise training decreases proinflammatory profile in Zucker diabetic (type 2) fatty rats. *Nutrition*, 25: 330-9 (2009).
- 486. Mattusch F, Dufaux B, Heine O, Mertens I, Rost R.** Reduction of the plasma concentration of C-reactive protein following nine months of endurance training. *Int J Sports Med*, 21: 21-4 (2000).
- 487. de Lemos E T, Reis F, Baptista S, Pinto R, Sepodes B, Vala H, Rocha-Pereira P, Silva A S, Teixeira F.** Exercise training is associated with improved levels of C-reactive protein and adiponectin in ZDF (type 2) diabetic rats. *Med Sci Monit*, 13: BR168-74 (2007).
- 488. Pierce G L, Schofield R S, Casey D P, Hamlin S A, Hill J A, Braith R W.** Effects of exercise training on forearm and calf vasodilation and proinflammatory markers in recent heart transplant recipients: a pilot study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 15: 10-8 (2008).
- 489. Balducci S, Zanuso S, Nicolucci A, Fernando F, Cavallo S, Cardelli P, Fallucca S, Alessi E, Letizia C, Jimenez A, Fallucca F, Pugliese G.** Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 20: 608-17 (2010).
- 490. Adamopoulos S, Parissis J, Karatzas D, Kroupis C, Georgiadis M, Karavolias G, Paraskevaidis J, Koniavitou K, Coats A J S, Kremastinos D T.** Physical training modulates proinflammatory cytokines and the soluble Fas/soluble Fas ligand system in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 39: 653-63 (2002).
- 491. Troseid M, Lappégard K T, Claudi T, Damas J K, Morkrid L, Brendberg R, Mollnes T E.** Exercise reduces plasma levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 in subjects with the metabolic syndrome. *Eur Heart J*, 25: 349-55 (2004).
- 492. Niebauer J, Clark A L, M. Webb-Peploe K, Coats A J S.** Exercise training in chronic heart failure: effects on pro-inflammatory markers. *Eur J Heart Fail*, 7: 189-93 (2005).
- 493. Nassis G P, Papantakou K, Skenderi K, Triandafillopoulou M, Kavouras S A, Yannakoulia M, Chrousos G P, Sidossis L S.** Aerobic exercise training improves insulin sensitivity without changes in body weight, body fat, adiponectin, and inflammatory markers in overweight and obese girls. *Metabolism*, 54: 1472-9 (2005).
- 494. Marsh S A, Coombes J S.** Exercise and the endothelial cell. *Int J Cardiol*, 99: 165-9 (2005).
- 495. Petridou A, Chatzinikolaou A, Fatouros I, Mastorakos G, Mitrakou A, Chandrinou H, Papassotiriou I, Mougios V.** Resistance exercise does not affect the serum concentrations of cell adhesion molecules. *Br J Sports Med*, 41: 76-9; discussion 9 (2007).
- 496. Rehman J, Mills P J, Carter S M, Chou J, Thomas J, Maisel A S.** Dynamic exercise leads to an increase in circulating ICAM-1: further evidence for adrenergic modulation of cell adhesion. *Brain Behav Immun*, 11: 343-51 (1997).
- 497. Schmidt-Lucke C, Reinhold D, Ansorge S, Klein H U, Schmidt-Lucke J A.** Changes of plasma concentrations of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and vascular endothelial growth factor after increased perfusion of lower extremities in humans. *Endothelium*, 10: 159-65 (2003).
- 498. Bartzeliotou A I, Margeli A P, Tsironi M, Skenderi K, Bacoula C, Chrousos G P, Papassotiriou I.** Circulating levels of adhesion molecules and markers of endothelial activation in acute inflammation induced by prolonged brisk exercise. *Clin Biochem*, 40: 765-70 (2007).

499. Collins P, Ford I, Ball D, Macaulay E, Greaves M, Brittenden J. A preliminary study on the effects of exercising to maximum walking distance on platelet and endothelial function in patients with intermittent claudication. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 31: 266-73 (2006).
500. Nielsen H, Lyberg T. Long-distance running modulates the expression of leucocyte and endothelial adhesion molecules. *Scand J Immunol*, 60: 356-62 (2004).
501. Silvestro A, Scopacasa F, Oliva G, de Cristofaro T, Iuliano L, Brevetti G. Vitamin C prevents endothelial dysfunction induced by acute exercise in patients with intermittent claudication. *Atherosclerosis*, 165: 277-83 (2002).
502. Mizia-Stec K, Zahorska-Markiewicz B, Mandrecki T, Janowska J, Szulc A, Jastrzebska-Maj E. Serum levels of selected adhesion molecules in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol*, 83: 143-50 (2002).
503. Brevetti G, De Caterina M, Martone V D, Ungaro B, Corrado F, Silvestro A, de Cristofaro T, Scopacasa F. Exercise increases soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in patients with intermittent claudication. *Clin Hemorheol Microcirc*, 24: 193-9 (2001).
504. Akimoto T, Furudate M, Saitoh M, Sugiura K, Waku T, Akama T, Kono I. Increased plasma concentrations of intercellular adhesion molecule-1 after strenuous exercise associated with muscle damage. *Eur J Appl Physiol*, 86: 185-90 (2002).
505. Silvestro A, Schiano V, Bucur R, Brevetti G, Scopacasa F, Chiariello M. Effect of propionylcarnitine on changes in endothelial function and plasma levels of adhesion molecules induced by acute exercise in patients with intermittent claudication. *Angiology*, 57: 145-54 (2006).
506. Boos C J, Balakrishnan B, Lip G Y H. The effects of exercise stress testing on soluble E-selectin, von Willebrand factor, and circulating endothelial cells as indices of endothelial damage/dysfunction. *Ann Med*, 40: 66-73 (2008).
507. Lara Fernandes J, Serrano C V, Jr., Toledo F, Hunziker M F, Zamperini A, Teo F H, Oliveira R T, Blotta M H, Rondon M U, Negrao C E. Acute and chronic effects of exercise on inflammatory markers and B-type natriuretic peptide in patients with coronary artery disease. *Clin Res Cardiol*, 100: 77-84 (2011).
508. Nemet D, Mills P J, Cooper D M. Effect of intense wrestling exercise on leucocytes and adhesion molecules in adolescent boys. *Br J Sports Med*, 38: 154-8 (2004).
509. Simpson R J, Florida-James G D, Whyte G P, Guy K. The effects of intensive, moderate and downhill treadmill running on human blood lymphocytes expressing the adhesion/activation molecules CD54 (ICAM-1), CD18 (beta2 integrin) and CD53. *Eur J Appl Physiol*, 97: 109-21 (2006).
510. Goebel M U, Mills P J. Acute psychological stress and exercise and changes in peripheral leukocyte adhesion molecule expression and density. *Psychosom Med*, 62: 664-70 (2000).
511. Mills P J, Hong S, Redwine L, Carter S M, Chiu A, Ziegler M G, Dimsdale J E, Maisel A S. Physical fitness attenuates leukocyte-endothelial adhesion in response to acute exercise. *J Appl Physiol*, 101: 785-8 (2006).
512. Adamopoulos S, Parissis J, Kroupis C, Georgiadis M, Karatzas D, Karavolias G, Koniavitou K, Coats A J, Kremastinos D T. Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J*, 22: 791-7 (2001).
513. Wang J S, Li Y S, Chen J C, Chen Y W. Effects of exercise training and deconditioning on platelet aggregation induced by alternating shear stress in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25: 454-60 (2005).
514. Sabatier M J, Schwark E H, Lewis R, Sloan G, Cannon J, McCully K. Femoral artery remodeling after aerobic exercise training without weight loss in women. *Dyn Med*, 7: 13 (2008).
515. Ostergard T, Nyholm B, Hansen T K, Rasmussen L M, Ingerslev J, Sorensen K E, Botker H E, Saltin B, Schmitz O. Endothelial function and biochemical vascular markers in first-degree relatives of type 2 diabetic patients: the effect of exercise training. *Metabolism*, 55: 1508-15 (2006).
516. Seneczko F. White blood cell count and adherence in sportsmen and non-training subjects. *Acta Physiol Pol*, 34: 601-10 (1983).



- 517. Zoppini G, Targher G, Zamboni C, Venturi C, Cacciatori V, Moghetti P, Muggeo M.** Effects of moderate-intensity exercise training on plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in older patients with type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 16: 543-9 (2006).
- 518. Saetre T, Enoksen E, Lyberg T, Strandén E, Jørgensen J J, Sundhagen J O, Hisdal J.** Supervised exercise training reduces plasma levels of the endothelial inflammatory markers e-selectin and icam-1 in patients with peripheral arterial disease. *Angiology*, 62: 301-5 (2011).
- 519. Nawaz S, Walker R D, Wilkinson C H, Saxton J M, Pockley A G, Wood R F.** The inflammatory response to upper and lower limb exercise and the effects of exercise training in patients with claudication. *J Vasc Surg*, 33: 392-9 (2001).
- 520. Hatunic M, Finucane F, Burns N, Gasparro D, Nolan J J.** Vascular inflammatory markers in early-onset obese and type 2 diabetes subjects before and after three months' aerobic exercise training. *Diab Vasc Dis Res*, 4: 231-4 (2007).
- 521. Yang A L, Chen H I.** Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. *Atherosclerosis*, 169: 11-7 (2003).
- 522. Pastva A, Estell K, Schoeb T R, Atkinson T P, Schwiebert L M.** Aerobic exercise attenuates airway inflammatory responses in a mouse model of atopic asthma. *J Immunol*, 172: 4520-6 (2004).
- 523. Chakraphan D, Sridulyakul P, Thipakorn B, Bunnag S, Huxley V H, Patumraj S.** Attenuation of endothelial dysfunction by exercise training in STZ-induced diabetic rats. *Clin Hemorheol Microcirc*, 32: 217-26 (2005).
- 524. Ding Y, Young C, Luan X, Li J, Rafols J, Clark J, McAllister J, Ding Y.** Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion. *Acta Neuropathol*, 109: 237-46 (2005).
- 525. Smith J E.** Effects of strenuous exercise on haemostasis. *Br J Sports Med*, 37: 433-5 (2003).
- 526. Albert C M, Mittleman M A, Chae C U, Lee I M, Hennekens C H, Manson J E.** Triggering of sudden death from cardiac causes by vigorous exertion. *N Engl J Med*, 343: 1355-61 (2000).
- 527. Bartsch P.** Platelet activation with exercise and risk of cardiac events. *Lancet*, 354: 1747-8 (1999).
- 528. Arai M, Yorifuji H, Ikematsu S, Nagasawa H, Fujimaki M, Fukutake K, Katsumura T, Ishii T, Iwane H.** Influences of strenuous exercise (triathlon) on blood coagulation and fibrinolytic system. *Thromb Res*, 57: 465-71. (1990).
- 529. Hansen J B, Wilsgard L, Olsen J O, Osterud B.** Formation and persistence of procoagulant and fibrinolytic activities in circulation after strenuous physical exercise. *Thromb Haemost*, 64: 385-9 (1990).
- 530. Bartsch P, Welsch B, Albert M, Friedmann B, Levi M, Kruthof E K.** Balanced activation of coagulation and fibrinolysis after a 2-h triathlon. *Med Sci Sports Exerc*, 27: 1465-70 (1995).
- 531. Hilberg T, Schmidt V, Glaser D, Schammne D, Losche W, Gabriel H H.** Platelet activity, sensitivity to agonist, and platelet-leukocyte conjugate formation after long-term exercise. *Platelets*, 13: 273-7 (2002).
- 532. Mockel M, Ulrich N V, Heller G, Jr., Rocker L, Hansen R, Riess H, Patscheke H, Stork T, Frei U, Ruf A.** Platelet activation through triathlon competition in ultra-endurance trained athletes: impact of thrombin and plasmin generation and catecholamine release. *Int J Sports Med*, 22: 337-43 (2001).
- 533. Weiss C, Welsch B, Albert M, Friedmann B, Strobel G, Jost J, Nawroth P, Bartsch P.** Coagulation and thrombomodulin in response to exercise of different type and duration. *Med Sci Sports Exerc*, 30: 1205-10 (1998).
- 534. Wang J-S.** Intense exercise increases shear-induced platelet aggregation in men through enhancement of von Willbrand factor binding, glycoprotein IIb/IIIa activation, and P-selectin expression on platelets. *Eur J Appl Physiol*, 91: 741-7 (2004).
- 535. Wang J S, Jen C J, Kung H C, Lin L J, Hsiue T R, Chen H I.** Different effects of strenuous exercise and moderate exercise on platelet function in men. *Circulation*, 90: 2877-85 (1994).

- 536. Singh I, Quinn H, Mok M, Southgate R J, Turner A H, Li D, Sinclair A J, Hawley J A.** The effect of exercise and training status on platelet activation: do cocoa polyphenols play a role? *Platelets*, 17: 361-7 (2006).
- 537. Wang J S, Jen C J, Chen H I.** Effects of chronic exercise and deconditioning on platelet function in women. *J Appl Physiol*, 83: 2080-5 (1997).
- 538. Kestin A S, Ellis P A, Barnard M R, Errichetti A, Rosner B A, Michelson A D.** Effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity. *Circulation*, 88: 1502-11 (1993).
- 539. van den Burg P J, Hospers J E, Mosterd W L, Bouma B N, Huisveld I A.** Aging, physical conditioning, and exercise-induced changes in hemostatic factors and reaction products. *J Appl Physiol*, 88: 1558-64 (2000).
- 540. Wannamethee S G, Lowe G D, Whincup P H, Rumley A, Walker M, Lennon L.** Physical activity and hemostatic and inflammatory variables in elderly men. *Circulation*, 105: 1785-90 (2002).
- 541. Suzuki T, Yamauchi K, Yamada Y, Furumichi T, Furui H, Tsuzuki J, Hayashi H, Sotobata I, Saito H.** Blood coagulability and fibrinolytic activity before and after physical training during the recovery phase of acute myocardial infarction. *Clin Cardiol*, 15: 358-64 (1992).
- 542. Dumortier M, Perez-Martin A, Pierrisnard E, Mercier J, Brun J F.** Regular exercise (3x45 min/wk) decreases plasma viscosity in sedentary obese, insulin resistant patients parallel to an improvement in fitness and a shift in substrate oxidation balance. *Clin Hemorheol Microcirc*, 26: 219-29 (2002).
- 543. Surmen-Gur E, Ozturk E, Gur H, Punduk Z, Tuncel P.** Effect of vitamin E supplementation on post-exercise plasma lipid peroxidation and blood antioxidant status in smokers: with special reference to haemoconcentration effect. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 79: 472-8 (1999).
- 544. Volek J S, Kraemer W J, Rubin M R, Gomez A L, Ratamess N A, Gaynor P.** L-Carnitine L-tartrate supplementation favorably affects markers of recovery from exercise stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282: E474-82 (2002).
- 545. Vollaard N B, Shearman J P, Cooper C E.** Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med*, 35: 1045-62 (2005).
- 546. Alessio H M, Hagerman A E, Fulkerson B K, Ambrose J, Rice R E, Wiley R L.** Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc.*, 32: 1576-81 (2000).
- 547. Quindry J C, Stone W L, King J, Broeder C E.** The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*, 35: 1139-45 (2003).
- 548. Radak Z, Ogonovszky H, Dubecz J, Pavlik G, Sasvari M, Pucsok J, Berkes I, Csont T, Ferdinandy P.** Super-marathon race increases serum and urinary nitrotyrosine and carbonyl levels. *Eur J Clin Invest*, 33: 726-30 (2003).
- 549. Sahlin K, Ekberg K, Cizinsky S.** Changes in plasma hypoxanthine and free radical markers during exercise in man. *Acta Physiol Scand*, 142: 275-81 (1991).
- 550. Tanskanen M M, Uusitalo A L, Kinnunen H, Hakkinen K, Kyrolainen H, Atalay M.** Association of military training with oxidative stress and overreaching. *Med Sci Sports Exerc*, 43: 1552-60 (2011).
- 551. Nielsen H G, Hagberg I A, Lyberg T.** Marathon running leads to partial exhaustion of ROS-generating capacity in leukocytes. *Med Sci Sports Exerc*, 36: 68-73 (2004).
- 552. Nielsen H G, Opstad P K, Lyberg T.** LeuCAM and reactive oxygen species during long-term exercise combined with sleep and energy deficiency. *Med Sci Sports Exerc*, 39: 275-82 (2007).
- 553. Criswell D, Powers S, Dodd S, Lawler J, Edwards W, Renshler K, Grinton S.** High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med Sci Sports Exerc*, 25: 1135-40 (1993).
- 554. Djordjevic D, Cubrilo D, Macura M, Barudzic N, Djuric D, Jakovljevic V.** The influence of training status on oxidative stress in young male handball players. *Mol Cell Biochem*, 351: 251-9 (2011).
- 555. Majerczak J, Rychlik B, Grzelak A, Grzmil P, Karasinski J, Pierzchalski P, Pulaski L, Bartosz G, Zoladz J A.** Effect of 5-week moderate intensity endurance training on the oxidative stress, muscle specific uncoupling protein (UCP3) and superoxide dismutase (SOD2) contents in vastus lateralis of young, healthy men. *J Physiol Pharmacol*, 61: 743-51 (2010).

556. Menegali B T, Nesi R T, Souza P S, Silva L A, Silveira P C, Valenca S S, Pinho R A. The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. *Pulm Pharmacol Ther*, 22: 567-73 (2009).
557. Pinho R A, Andrades M E, Oliveira M R, Pirola A C, Zago M S, Silveira P C, Dal-Pizzol F, Moreira J C. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int*, 30: 848-53 (2006).
558. Powers S K, Criswell D, Lawler J, Ji L L, Martin D, Herb R A, Dudley G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, 266: R375-80 (1994).
559. Higuchi M, Cartier L J, Chen M, Holloszy J O. Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. *J Gerontol*, 40: 281-6 (1985).
560. Radak Z, Chung H Y, Naito H, Takahashi R, Jung K J, Kim H J, Goto S. Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. *FASEB J*, 18: 749-50 (2004).
561. Maeda S, Miyauchi T, Iemitsu M, Tanabe T, Goto K, Yamaguchi I, Matsuda M. Endothelin receptor antagonist reverses decreased NO system in the kidney in vivo during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286: E609-14 (2004).
562. Maeda S, Miyauchi T, Iemitsu M, Tanabe T, Irukayama-Tomobe Y, Goto K, Yamaguchi I, Matsuda M. Involvement of endogenous endothelin-1 in exercise-induced redistribution of tissue blood flow: an endothelin receptor antagonist reduces the redistribution. *Circulation*, 106: 2188-93 (2002).
563. Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Matsuda M, Goto K, Yamaguchi I. Time course alteration of endothelin-1 gene expression in the heart during exercise and recovery from post-exercise periods in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 44: S447-50 (2004).
564. Maeda S, Miyauchi T, Kobayashi T, Goto K, Matsuda M. Exercise causes tissue-specific enhancement of endothelin-1 mRNA expression in internal organs. *J Appl Physiol*, 85: 425-31 (1998).
565. Maeda S, Miyauchi T, Sakai S, Kobayashi T, Iemitsu M, Goto K, Sugishita Y, Matsuda M. Prolonged exercise causes an increase in endothelin-1 production in the heart in rats. *Am J Physiol*, 275: H2105-12 (1998).
566. Camsarl A, Pekdemir H, Cicek D, Polat G, Akkus M N, Doven O, Cin V G, Katlrcilbasl T, Parmakslz T. Endothelin-1 and nitric oxide concentrations and their response to exercise in patients with slow coronary flow. *Circ J*, 67: 1022-8 (2003).
567. Kasimay O, Yildirim A, Unal M, Kacar O, Bilsel S, Kurtel H. The involvement of nitric oxide and endothelin-1 in exercise-induced bronchospasm in young soccer players. *Clin J Sport Med*, 21: 237-42 (2011).
568. Mangiafico R A, Malatino L S, Spada R S, Santonocito M, Messina R, Dell'Arte S, Attina T. Treadmill exercise-induced release of endothelin-1 in patients with peripheral arterial occlusive disease at Fontaine stage IIb. *Int Angiol*, 19: 14-7 (2000).
569. Davis P G, Ferguson M A, Alderson N L, Pate R R, Bodary P F, Durstine J L. Effect of exercise duration on plasma endothelin-1 concentration. *J Sports Med Phys Fitness*, 45: 419-23 (2005).
570. Maeda S, Miyauchi T, Iemitsu M, Sugawara J, Nagata Y, Goto K. Resistance exercise training reduces plasma endothelin-1 concentration in healthy young humans. *J Cardiovasc Pharmacol*, 44: S443-6 (2004).
571. Maeda S, Sugawara J, Yoshizawa M, Otsuki T, Shimojo N, Jesmin S, Ajisaka R, Miyauchi T, Tanaka H. Involvement of endothelin-1 in habitual exercise-induced increase in arterial compliance. *Acta Physiol (Oxf)*, 196: 223-9 (2009).
572. Doutreleau S, Piquard F, Lonsdorfer E, Rouyer O, Lampert E, Mettauer B, Richard R, Geny B. Improving exercise capacity, 6 wk training tends to reduce circulating endothelin after heart transplantation. *Clin Transplant*, 18: 672-5 (2004).
573. Maeda S, Tanabe T, Miyauchi T, Otsuki T, Sugawara J, Iemitsu M, Kuno S, Ajisaka R, Yamaguchi I, Matsuda M. Aerobic exercise training reduces plasma endothelin-1 concentration in older women. *J Appl Physiol*, 95: 336-41 (2003).



- 574. Otsuki T, Maeda S, Iemitsu M, Saito Y, Tanimura Y, Ajisaka R, Goto K, Miyauchi T.** Effects of athletic strength and endurance exercise training in young humans on plasma endothelin-1 concentration and arterial distensibility. *Exp Biol Med (Maywood)*, 231: 789-93 (2006).
- 575. Lawson D L, Chen L, Mehta J L.** Effects of exercise-induced oxidative stress on nitric oxide release and antioxidant activity. *Am J Cardiol*, 80: 1640-2 (1997).
- 576. McKeever K H, Antas L A, Kearns C F.** Endothelin response during and after exercise in horses. *Vet J*, 164: 38-46 (2002).
- 577. Roberts C K, Barnard R J, Jasman A, Balon T W.** Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am J Physiol*, 277: E390-4 (1999).
- 578. Pattwell D M, Jackson M J.** Contraction-induced oxidants as mediators of adaptation and damage in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev*, 32: 14-8 (2004).
- 579. Zago A S, Zanesco A.** Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. *Arq Bras Cardiol*, 87: e264-70 (2006).
- 580. Green D J, Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R.** Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol*, 561: 1-25 (2004).
- 581. Roberts C K, Vaziri N D, Barnard R J.** Effect of diet and exercise intervention on blood pressure, insulin, oxidative stress, and nitric oxide availability. *Circulation*, 106: 2530-2 (2002).
- 582. Higashi Y, Sasaki S, Sasaki N, Nakagawa K, Ueda T, Yoshimizu A, Kurisu S, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T.** Daily aerobic exercise improves reactive hyperemia in patients with essential hypertension. *Hypertension*, 33: 591-7 (1999).
- 583. Griffin K L, Laughlin M H, Parker J L.** Exercise training improves endothelium-mediated vasorelaxation after chronic coronary occlusion. *J Appl Physiol*, 87: 1948-56 (1999).
- 584. McAllister R M, Newcomer S C, Laughlin M H.** Vascular nitric oxide: effects of exercise training in animals. *Appl Physiol Nutr Metab*, 33: 173-8 (2008).
- 585. Connes P, Machado R F, Hue O, Reid H.** Exercise limitation, exercise testing and exercise recommendations in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc*, 49: 151-63 (2011).
- 586. Bile A, Le Gallais D, Mercier J, Bogui P, Prefaut C.** Sickle cell trait in Ivory Coast athletic throw and jump champions, 1956-1995. *Int J Sports Med*, 19: 215-9 (1998).
- 587. Le Gallais D, Bogui P, Dulat C, Arra J, Prefaut C, Lonsdorfer J.** Participation d'adolescents drépanocytaires AS à une course de 3000 mètres. *Sci Sports*, 4: 123-8 (1989).
- 588. Le Gallais D, Lonsdorfer J, Bogui P, Mercier J, Macabies J, Prefaut C.** Trait drépanocytaire (AS) et performances en courses de vitesse, de résistance et d'endurance. *Sci Sports*, 4: 249-51 (1989).
- 589. Le Gallais D, Lonsdorfer J, Fabritius H, Bogui P, Sangare A, Cabannes R.** Prevalence of the sickle cell trait among students in a physical education college in Côte-d'Ivoire. *Nouv Rev Fr Hematol*, 31: 409-12 (1989).
- 590. Le Gallais D, Préfaut C, Dulat C, Macabies J, Lonsdorfer J.** Sickle cell trait in Ivory Coast athletic champions, 1956-1989. *Int J Sports Med*, 12: 509-10 (1991).
- 591. Le Gallais D, Préfaut C, Mercier J, Bile A, Bogui P, Lonsdorfer J.** Sickle cell trait as a limiting factor for high-level performance in a semi-marathon. *Int J Sports Med*, 15: 399-402 (1994).
- 592. Weisman I M, Zeballos R J, Martin T W, Johnson B D.** Effect of Army basic training in sickle-cell trait. *Arch Intern Med*, 148: 1140-4 (1988).
- 593. Bergeron M F, Cannon J G, Hall E L, Kutlar A.** Erythrocyte sickling during exercise and thermal stress. *Clin J Sport Med*, 14: 354-6 (2004).
- 594. Hedreville M, Connes P, Romana M, Magnaval G, David T, Hardy-Dessources M-D, Belloy M-S, Etienne-Julan M, Hue O.** Central retinal vein occlusion in a sickle cell trait carrier after a cycling race. *Med Sci Sports Exerc*, 41: 14-8 (2009).
- 595. Dincer H E, Raza T.** Compartment syndrome and fatal rhabdomyolysis in sickle cell trait. *WMI*, 104: 67-71 (2005).
- 596. Harrelson G, Fincher A, Robinson J.** Acute Exertional Rhabdomyolysis and Its Relationship to Sickle Cell Trait. *J Athl Train*, 30: 309-12 (1995).
- 597. Le Gallais D, Bile A, Mercier J, Paschel M, Tonellot J L, Dauverchain J.** Exercise-induced death in sickle cell trait: role of aging, training, and deconditioning. *Med Sci Sports Exerc*, 28: 541-4 (1996).

598. Mitchell B L. Sick cell trait and sudden death--bringing it home. *J Natl Med Assoc*, 99: 300-5 (2007).
599. Pretzlaff R K. Death of an adolescent athlete with sickle cell trait caused by exertional heat stroke. *Pediatr Crit Care Med* 3:308-10 (2002).
600. Wirthwein D P, Spotswood S D, Barnard J J, Prahlow J A. Death due to microvascular occlusion in sickle-cell trait following physical exertion. *J Forensic Sci*, 46: 399-401 (2001).
601. Ferster K, Eichner E R. Exertional sickling deaths in Army recruits with sickle cell trait. *Mil Med*, 177: 56-9 (2012).
602. Marlin L, Connes P, Antoine-Jonville S, Tripette J, Montout-Hedreville M, Sanouiller A, Etienne-Julan M, Hue O. Cardiorespiratory responses during three repeated incremental exercise tests in sickle cell trait carriers. *Eur J Appl Physiol*, 102: 181-7 (2008).
603. Weisman I M, Zeballos R J, Johnson B D. Cardiopulmonary and gas exchange responses to acute strenuous exercise at 1,270 meters in sickle cell trait. *Am J Med*, 84: 377-83 (1988).
604. Robinson J R, Stone W J, Asendorf A C. Exercise capacity of black sickle cell trait males. *Med Sci Sports*, 8: 244-5 (1976).
605. Messonnier L, Samb A, Tripette J, Gogh B D, Loko G, Sall N D, Feasson L, Hue O, Lamothe S, Bogui P, Connes P. Moderate endurance exercise is not a risk for rhabdomyolysis or renal failure in sickle cell trait carriers. *Clin Hemorheol Microcirc*: [sous presse] (2012).
606. Weisman I M, Zeballos R J, Johnson B D. Effect of moderate inspiratory hypoxia on exercise performance in sickle cell trait. *Am J Med*, 84: 1033-40 (1988).
607. Le Gallais D, Lonsdorfer J, Buguet A, Daures J P, Mercier J, Macabies J, Prefaut C. Aptitude physique des porteurs du trait drépanocytaire. *Sci Sports*, 2: 269-77 (1987).
608. Martin T W, Weisman I M, Zeballos R J, Stephenson S R. Exercise and hypoxia increase sickling in venous blood from an exercising limb in individuals with sickle cell trait. *Am J Med*, 87: 48-56 (1989).
609. Thiriet P, Le Hesran J Y, Wouassi D, Bitanga E, Gozal D, Louis F J. Sickle cell trait performance in a prolonged race at high altitude. *Med Sci Sports Exerc*, 26: 914-8 (1994).
610. Tripette J, Hardy-Dessources M D, Sara F, Montout-Hedreville M, Saint-Martin C, Hue O, Connes P. Does repeated and heavy exercise impair blood rheology in carriers of sickle cell trait? *Clin J Sport Med*, 17: 465-70 (2007).
611. Connes P, Racinais S, Sra F, Marlin L, Hertogh C, Saint-Martin C, Etienne-Julan E, Hue O. Does the pattern of repeated sprint ability differ between sickle cell trait carriers and healthy subjects. *Int J Sports Med*, 27: 937-42 (2006).
612. Tripette J, Connes P, Beltan E, Chalabi T, Marlin L, Chout R, Baskurt O K, Hue O, Hardy-Dessources M D. Red blood cell deformability and aggregation, cell adhesion molecules, oxidative stress and nitric oxide markers after a short term, submaximal, exercise in sickle cell trait carriers. *Clin Hemorheol Microcirc*, 45: 39-52 (2010).
613. Tripette J, Loko G, Samb A, Gogh B D, Sewade E, Seck D, Hue O, Romana M, Diop S, Diaw M, Brudey K, Bogui P, Cisse F, Hardy-Dessources M D, Connes P. Effects of hydration and dehydration on blood rheology in sickle cell trait carriers during exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299: H908-14 (2010).
614. Chirico E N, Martin C, Faes C, Feasson L, Oyono-Enguelle S, Aufradet E, Dubouchaud H, Francina A, Canet-Soulas E, Thiriet P, Messonnier L A, Pialoux V. Exercise training blunts oxidative stress in sickle cell trait carriers. *J Appl Physiol*, 112: 1445-53 (2012).
615. Faës C, Martin C, Chirico E N, Feasson L, Oyono-Enguelle S, Dubouchaud H, Francina A, Thiriet P, Pialoux V, Messonnier L. Effect of alpha-thalassemia on exercise-induced oxidative stress in sickle cell trait. *Acta Physiol*: [sous presse] (2012).
616. Das S K, Hinds J E, Hardy R E, Collins J C, Mukherjee S. Effects of physical stress on peroxide scavengers in normal and sickle cell trait erythrocytes. *Free Radic Biol Med*, 14: 139-47 (1993).
617. Beltan E, Chalabi T, Tripette J, Chout R, Connes P. Coagulation responses after a submaximal exercise in sickle cell trait carriers. *Thromb Res*, 127: 167-9 (2011).
618. Loosemore M, Walsh S B, Morris E, Stewart G, Porter J B, Montgomery H. Sudden exertional death in sickle cell trait. *Br J Sports Med*, 46: 312-4 (2012).

619. ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med*, 166: 111-7 (2002).
620. Sachdev V, Kato G J, Gibbs J S, Barst R J, Machado R F, Nouraie M, Hassell K L, Little J A, Schraufnagel D E, Krishnamurti L, Novelli E M, Girgis R E, Morris C R, Rosenzweig E B, Badesch D B, Lanzkron S, Castro O L, Taylor J G t, Hannoush H, Goldsmith J C, Gladwin M T, Gordeuk V R. Echocardiographic Markers of Elevated Pulmonary Pressure and Left Ventricular Diastolic Dysfunction Are Associated With Exercise Intolerance in Adults and Adolescents With Homozygous Sickle Cell Anemia in the United States and United Kingdom. *Circulation*, 124: 1452-60 (2011).
621. Anthi A, Machado R F, Jison M L, Taveira-Dasilva A M, Rubin L J, Hunter L, Hunter C J, Coles W, Nichols J, Avila N A, Sachdev V, Chen C C, Gladwin M T. Hemodynamic and functional assessment of patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 175: 1272-9 (2007).
622. Machado R F, Barst R J, Yovetich N A, Hassell K L, Kato G J, Gordeuk V R, Gibbs J S, Little J A, Schraufnagel D E, Krishnamurti L, Girgis R E, Morris C R, Rosenzweig E B, Badesch D B, Lanzkron S, Onyekwere O, Castro O L, Sachdev V, Waclawiw M A, Woolson R, Goldsmith J C, Gladwin M T. Hospitalization for pain in patients with sickle cell disease treated with sildenafil for elevated TRV and low exercise capacity. *Blood*, 118: 855-64 (2011).
623. Parent F, Bachir D, Inamo J, Lionnet F, Driss F, Loko G, Habibi A, Bennani S, Savale L, Adnot S, Maitre B, Yaici A, Hajji L, O'Callaghan D S, Clerson P, Girot R, Galacteros F, Simonneau G. A hemodynamic study of pulmonary hypertension in sickle cell disease. *N Engl J Med*, 365: 44-53 (2011).
624. Gladwin M T, Sachdev V. Cardiovascular abnormalities in sickle cell disease. *J Am Coll Cardiol*, 59: 1123-233 (2012).
625. Knight-Madden J M, Forrester T S, Lewis N A, Greenough A. Asthma in children with sickle cell disease and its association with acute chest syndrome. *Thorax*, 60: 206-10 (2005).
626. Delclaux C, Zerah-Lancner F, Bachir D, Habibi A, Monin J L, Godeau B, Galacteros F. Factors associated with dyspnea in adult patients with sickle cell disease. *Chest*, 128: 3336-44 (2005).
627. Barst R J, Mubarak K K, Machado R F, Ataga K I, Benza R L, Castro O, Naeije R, Sood N, Swerdlow P S, Hildesheim M, Gladwin M T. Exercise capacity and haemodynamics in patients with sickle cell disease with pulmonary hypertension treated with bosentan: results of the ASSET studies. *Br J Haematol*, 149: 426-35 (2010).
628. Little J A, Hauser K P, Martyr S E, Harris A, Maric I, Morris C R, Suh J H, Taylor J, Castro O, Machado R, Kato G, Gladwin M T. Hematologic, biochemical, and cardiopulmonary effects of L-arginine supplementation or phosphodiesterase 5 inhibition in patients with sickle cell disease who are on hydroxyurea therapy. *Eur J Haematol*, 82: 315-21 (2009).
629. Minniti C P, Machado R F, Coles W A, Sachdev V, Gladwin M T, Kato G J. Endothelin receptor antagonists for pulmonary hypertension in adult patients with sickle cell disease. *Br J Haematol*, 147: 737-43 (2009).
630. Balayssac-Siransy E, Connes P, Tuo N, Danho C, Diaw M, Sanogo I, Hardy-Dessources M-D, Samb A, Ballas S K, Bogui P. Mild haemorheological changes induced by a moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol*, 154: 398-407 (2011).
631. Platt O S. Exercise-induced hemolysis in sickle cell anemia: shear sensitivity and erythrocyte dehydration. *Blood*, 59: 1055-60 (1982).
632. McConnell M E, Daniels S R, Lobel J, James F W, Kaplan S. Hemodynamic response to exercise in patients with sickle cell anemia. *Pediatr Cardiol*, 10: 141-4 (1989).
633. Pianosi P, D'Souza S J, Esseltine D W, Charge T D, Coates A L. Ventilation and gas exchange during exercise in sickle cell anemia. *Am Rev Respir Dis*, 143: 226-30 (1991).
634. Moheeb H, Wali Y A, El-Sayed M S. Physical fitness indices and anthropometrics profiles in schoolchildren with sickle cell trait/disease. *Am J Hematol*, 82: 91-7 (2007).
635. Waltz X, Hedreville M, Sinnapah S, Lamarre Y, Soter V, Lemonne N, Etienne-Julan M, Beltan E, Chalabi T, Chout R, Hue O, Mougénel 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*: [sous presse] (2012).

- 636. Millis R M, Baker F W, Ertugrul L, Douglas R M, Sexcius L.** Physical performance decrements in children with sickle cell anemia. *J Natl Med Assoc*, 86: 113-6 (1994).
- 637. Callahan L A, Woods K F, Mensah G A, Ramsey L T, Barbeau P, Gutin B.** Cardiopulmonary Responses to Exercise in Women with Sickle Cell Anemia. *Am J Respir Crit Care Med*, 165: 1309-16 (2002).
- 638. Alcorn R, Bowser B, Henley E J, Holloway V.** Fluidotherapy and exercise in the management of sickle cell anemia. A clinical report. *Phys Ther*, 64: 1520-2 (1984).
- 639. Tinti G, Somera R, Jr., Valente F M, Domingos C R B.** Benefits of kinesiotherapy and aquatic rehabilitation on sickle cell anemia. A case report. *Genet Mol Res*, 9: 360-4 (2010).
- 640. Scharf M, Brem M H, Wilhelm M, Schoepf U J, Uder M, Lell M M.** Cardiac magnetic resonance assessment of left and right ventricular morphologic and functional adaptations in professional soccer players. *Am Heart J*, 159: 911-8 (2010).
- 641. Konhilas J P, Maass A H, Luckey S W, Stauffer B L, Olson E N, Leinwand L A.** Sex modifies exercise and cardiac adaptation in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H2768-76 (2004).
- 642. De Franceschi L, Malpeli G, Scarpa A, Janin A, Muchitsch E M, Roncada P, Leboeuf C, Corrocher R, Beuzard Y, Brugnara C.** Protective effects of S-nitrosoalbumin on lung injury induced by hypoxia-reoxygenation in mouse model of sickle cell disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 291: L457-65 (2006).
- 643. Beckman J S, Koppenol W H.** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271: C1424-37 (1996).
- 644. Lopez D, Orta X, Casos K, Saiz M P, Puig-Parellada P, Farriol M, Mitjavila M T.** Upregulation of endothelial nitric oxide synthase in rat aorta after ingestion of fish oil-rich diet. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H567-72 (2004).

# **F . Annexes**

# Annexe 1

---

## **L'entraînement physique atténue le stress oxydatif chez les porteurs du trait drépanocytaire**

---

E.N. Chirico, C.Martin, C.Faës, L.Féasson, S.Oyono-Enguélé, E.Aufradet, H.Dubouchaud, A.Francina, E.Canet-Soulas, P.Thiriet, L.Messonnier, and V.Pialoux.

Publié dans *Journal of applied Physiology* en 2012.

Volume 112 ; pages 1445-1453.

---



## Exercise training blunts oxidative stress in sickle cell trait carriers

Erica N. Chirico,<sup>1,2</sup> Cyril Martin,<sup>1</sup> Camille Faës,<sup>1</sup> Léonard Féasson,<sup>3,4</sup> Samuel Oyono-Enguélé,<sup>5</sup> Emeline Aufradet,<sup>1</sup> Hervé Dubouchaud,<sup>6</sup> Alain Francina,<sup>7</sup> Emmanuelle Canet-Soulas,<sup>2</sup> Patrice Thiriet,<sup>1</sup> Laurent Messonnier,<sup>3\*</sup> and Vincent Pialoux<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Center of Research and Innovation on Sports, University Claude Bernard Lyon 1, University of Lyon, Villeurbanne;

<sup>2</sup>CarMeN, INSERM, University Claude Bernard Lyon 1, Faculty of Medicine Lyon Sud, Oullins; <sup>3</sup>Laboratory of Exercise Physiology, University of Savoie and University of Saint-Etienne, Le Bourget du Lac and Saint-Etienne, France; <sup>4</sup>Unit of Myology, University Hospital Center of Saint Etienne, France; <sup>5</sup>Laboratory of Physiology, Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon; <sup>6</sup>Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, INSERM, University Joseph Fourier, Grenoble; and <sup>7</sup>Unité de Pathologie Moléculaire de l'Hémoglobine, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

**Chirico EN, Martin C, Faës C, Féasson L, Oyono-Enguélé S, Aufradet E, Dubouchaud H, Francina A, Canet-Soulas E, Thiriet P, Messonnier L, Pialoux V.** Exercise training blunts oxidative stress in sickle cell trait carriers. *J Appl Physiol* 112: 1445–1453, 2012. First published February 9, 2012; doi:10.1152/jappphysiol.01452.2011.—The aim of this study was to analyze the effects of exercise training on oxidative stress in sickle cell trait carriers. Plasma levels of oxidative stress [advanced oxidation protein products (AOPP), protein carbonyl, malondialdehyde (MDA), and nitrotyrosine], antioxidant markers [catalase, glutathione peroxidase (GPX), and superoxide dismutase (SOD)], and nitrite and nitrate (NOx) were assessed at baseline, immediately following a maximal exercise test ( $T_{ex}$ ), and during recovery ( $T_{1h}$ ,  $T_{2h}$ ,  $T_{24h}$ ) in trained (T: 8 h/wk minimum) and untrained (U: no regular physical activity) sickle cell trait (SCT) carriers or control (CON) subjects (T-SCT,  $n = 10$ ; U-SCT,  $n = 8$ ; T-CON,  $n = 11$ ; and U-CON,  $n = 11$ ; age:  $23.5 \pm 2.2$  yr). The trained subjects had higher SOD activities ( $7.6 \pm 5.4$  vs.  $5.2 \pm 2.1$  U/ml,  $P = 0.016$ ) and lower levels of AOPP ( $142 \pm 102$  vs.  $177 \pm 102$   $\mu$ M,  $P = 0.028$ ) and protein carbonyl ( $82.1 \pm 26.0$  vs.  $107.3 \pm 30.6$  nm/ml,  $P = 0.010$ ) than the untrained subjects in response to exercise. In response to exercise, U-SCT had a higher level of AOPP ( $224 \pm 130$  vs.  $174 \pm 121$   $\mu$ M,  $P = 0.012$ ), nitrotyrosine ( $127 \pm 29.1$  vs.  $70.6 \pm 46.6$  nM,  $P = 0.003$ ), and protein carbonyl ( $114 \pm 34.0$  vs.  $86.9 \pm 26.8$  nm/ml,  $P = 0.006$ ) compared with T-SCT. T-SCT had a higher SOD activity ( $8.50 \pm 7.2$  vs.  $4.30 \pm 2.5$  U/ml,  $P = 0.002$ ) and NOx ( $28.8 \pm 11.4$  vs.  $14.6 \pm 7.0$   $\mu$ mol $\cdot$ l $^{-1}\cdot$ min $^{-1}$ ,  $P = 0.003$ ) in response to exercise than U-SCT. Our data indicate that the overall oxidative stress and nitric oxide response is improved in exercise-trained SCT carriers compared with their untrained counterparts. These results suggest that physical activity could be a viable method of controlling the oxidative stress. This could have a beneficial impact because of its involvement in endothelial dysfunction and subsequent vascular impairment in hemoglobin S carriers.

antioxidants; physical activity; hemoglobin

SICKLE CELL DISEASE (SCD) is a hemoglobinopathy resulting from a single mutation in the  $\beta$ -globin chain gene, inducing the substitution of valine for glutamic acid at the sixth amino acid position. This mutation leads to the production of abnormal hemoglobin (HbS). The pathogenesis of SCD occurs due to the polymerization of deoxygenated HbS, eventually leading to the rigidity and sickling of red blood cells (RBC). The

most deleterious pathophysiological effects of sickling include endothelial dysfunction, inflammation, and vaso-occlusion (65). All these events can be traced back to an increase in oxidative stress, defined as a damaging imbalance between the production of oxidants and antioxidants (63, 66). Endothelial dysfunction, which can cause increased adhesion in the vessels leading to vaso-occlusion, hypoxia, and hemolysis, is notably due to the impairment of nitric oxide bioavailability (1, 35). Vaso-occlusion and hypoxia can generate superoxide, whereas hemolysis can inhibit NO production while generating more reactive oxygen species (66).

Subjects who present both normal [hemoglobin A (HbA)] and sickled hemoglobin (HbS) are identified as sickle cell trait (SCT) carriers. SCT is usually considered to be a benign and asymptomatic condition (20). However, several authors suggest that SCT should be reclassified as a disease state (9, 10, 32). In fact, SCT has been linked as a cofactor for morbidity and mortality (32, 60, 69) due to complications at rest (69) and during exercise (30, 31, 34) particularly in hypoxic conditions (31). An increasing number of studies have reported exercise-related sudden deaths in SCT carriers (14, 20, 31, 34). The high incidence of exercise-related deaths in SCT could be a result of RBC abnormalities, such as decreased RBC deformability (32, 68) and endothelial damage (69), associated with an increase in oxidative stress (13, 23). This hypothesis is supported by the fact that 1) RBC sickling may increase during exercise in SCT carriers (6, 2) sickle erythrocytes overproduce reactive oxygen species (ROS) (13, 23), 3) SCT carriers increase RBC oxidative stress during exercise (12), and 4) ROS induce a cascade of events including endothelial dysfunction and adhesion potentially leading to vascular occlusion (1). Taken together, these results lead to the hypothesis that oxidative stress could be involved in exercise-related complications through the vascular dysfunction mechanism seen in SCT.

In various situations, exercise training has been shown to decrease oxidative stress through an upregulation in the antioxidant system, thereby halting the overproduction of oxidants (28, 53–55). In turn, this may improve cardiovascular function by reducing endothelial dysfunction, inflammation, and adhesion (24, 35). A recent paper by Aufradet et al. (3) demonstrated that the increased endothelial activation commonly occurring in SCT (47, 48) was attenuated in trained SCT carriers compared with the untrained carriers. This effect on adhesion molecules, which are regulated by nitric oxide and stimulated by ROS (33), suggests that a training effect could be

\* L. Messonnier and V. Pialoux contributed equally to the supervision of this work.

Address for reprint requests and other correspondence: V. Pialoux, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre de Recherche et d'Innovation sur le Sport, 69622 Villeurbanne Cedex, France (e-mail: vincent.pialoux@univ-lyon1.fr).



under the control of oxidative stress. However, to our knowledge there are no studies dealing with the effects of regular exercise training on oxidative stress and nitric oxide metabolism in SCT carriers.

The aim of the present study is to test the hypothesis that regular training improves NO metabolism and decreases oxidative stress, adhesion, and endothelial dysfunction in SCT subjects.

## METHODS

### Ethical Approval

The protocol was approved by the local ethics committee of Cameroon and was in accordance with the guidelines set by the Declaration of Helsinki. All of the subjects were volunteers and gave their written informed consent before participating in the study.

### Subjects

Eighteen SCT carriers ( $34.5 \pm 0.8\%$  HbS) and 22 subjects with normal hemoglobin (CON) participated in the study. All subjects were male students attending the University of Yaounde II (Soa, Cameroon). SCT and CON groups were divided into two subgroups on the basis of their fitness level. The 11 CON and 8 SCT who reported no regular physical activity for the two previous years were assigned to untrained (U) subgroups (U-CON and U-SCT). The 11 CON and 10 SCT who practiced soccer on a regular basis ( $>8$  h/wk minimum for several years) were assigned to trained (T) subgroups (T-CON and T-SCT). The group categorization of trained and untrained was confirmed by fitness level measured by relative maximal aerobic power as described in the results. Subjects completed a medical examination that included height and weight measurements, as well as a venous blood test to detect SCT and HIV. Exclusion criteria included the presence of a known chronic disease (hypertension, HIV), stroke, or recent malaria episode. No previous sickle cell crisis or other incident relating to hemoglobinopathy was reported in any subject.

### Exercise Protocol

All the experiments took place at General Hospital of Yaounde (Cameroon). The subjects were asked to avoid any strenuous exercise the day before the test. All meals before and after the exercise test were provided at the hospital and water was available ad libitum to ensure proper nutrition and hydration. An incremental maximal exercise test was performed on a cycle ergometer (Monark, 818E, Stockholm, Sweden). The test began with a 5-min warm up at 30 W, followed by a work rate of 70 W that was continuously increased by 35 W every 3 min until volitional exhaustion was reached. Heart rate (HR) was collected throughout the exercise using a chest belt monitor (Polar Electro, Kempele, Finland). Maximal HR ( $HR_{max}$ ; beats/min) was considered the highest recorded heart rate during the test. Maximal aerobic power (MAP; W) was assessed by linear interpolation from the HR vs. work rate curve. Blood samples were drawn from a catheterized antecubital vein on the nondominant arm and were collected at baseline (Base), immediately at the end of the exercise test ( $T_{ex}$ ), and after 1 h, 2 h, and 24 h of recovery ( $T_{1h}$ ,  $T_{2h}$ ,  $T_{24h}$ , respectively) in EDTA tubes. The samples were used to measure levels of oxidative stress [advanced oxidation protein products (AOPP), protein carbonyl, malondialdehyde (MDA), and nitrotyrosine], antioxidant [catalase, glutathione peroxidase (GPX), and superoxide dismutase (SOD)], and NO metabolism (NOx) markers, and adhesion molecules (P-selectin and E-selectin).

### SCT Confirmation, $\alpha$ -Thalassemia, and Hematological Parameters

To test for SCT, blood samples were collected in EDTA tubes at rest and the various Hb were isolated and quantified by ion-exchange

high-performance liquid chromatography (HPLC) (Variant I, Beta Thal Short Program: Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Positive test results for SCT were determined by the presence of HbS, but only if  $<50\%$  of total Hb. To test for the coexistence of  $\alpha$ -thalassemia, the technique described by Chong et al. (8) was used. The only type of  $\alpha$ -thalassemia found in some SCT carriers was the heterozygous form marked by a deletion of 3.7 kb of DNA, containing one of the two linked  $\alpha$ -globin genes ( $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ ). No other genetic Hb abnormality was found in this population. Blood for the hematological measurements was collected at rest in EDTA tubes and was analyzed using a hematology analyzer (Abbott Cell Dyn 1800 hematology analyzer, Block Scientific, NY).

### Oxidative Stress and Antioxidant Assessment

The blood samples collected at baseline,  $T_{ex}$ ,  $T_{1h}$ ,  $T_{2h}$ , and  $T_{24h}$  were centrifuged, and the aliquoted plasma was stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. All samples were assessed within the same time period.

**Plasma AOPP.** AOPP were determined in blood plasma using the semi-automated method developed by Witko-Sarsat et al. (70), as previously described (55). AOPP were measured by spectrometry on a microplate reader (TECAN Infinite M200, Mannedorf, Switzerland) and were calibrated with a chloramine-T solution that absorbs at 340 nm in the presence of potassium iodide. The absorbance of the reaction was immediately read at 340 nm on the microplate reader against a blank containing 200  $\mu\text{l}$  of PBS. AOPP activity was expressed as micromoles per liter of chloramines-T equivalents.

**Protein carbonyl.** Measurements of protein carbonyls can be used as an index of oxidative injury. Protein carbonyls were measured by spectrophotometry at 380 nm using 2,4-dinitrophenylhydrazine according to a method of Levine et al. (43).

**Catalase.** Catalase activity in the plasma was determined by the method of Johansson and Borg (29), using hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) as a substrate and formaldehyde as a standard. Catalase activity was determined by the formation rate of formaldehyde induced by the reaction of methanol and  $\text{H}_2\text{O}_2$  using catalase as enzyme.

**GPX.** GPX in the plasma was determined by the modified method of Paglia and Valentine (52), using  $\text{H}_2\text{O}_2$  as a substrate. GPX was determined by the rate of oxidation of NADPH to  $\text{NADP}^+$  after addition of glutathione reductase (GR), reduced glutathione (GSH), and NADPH.

**MDA.** Although MDA assay shows methodological limitations (42), it is the most common lipid peroxidation marker and it is still widely used as marker of oxidative stress. Concentrations of plasma MDA were determined as thiobarbituric reactive substances by a modified method of Ohkawa et al. (51), as previously described (53).

**NOx.** The end-products of endothelium nitric oxide and NOx were measured in the plasma using reagents purchased from Sigma-Aldrich based on methods previously described (45). The sum of nitrite and nitrate in the plasma (NOx) is considered an index of nitric oxide production (23).

**Nitrotyrosine.** Concentrations of plasma nitrotyrosine, as end product of protein nitration by  $\text{ONOO}^-$ , were measured as previously described (19). Nitrotyrosine was measured using reagents purchased from Sigma-Aldrich.

**SOD.** The quantitative determination of the SOD activity was performed using the Beauchamps and Fridovich's method (5), slightly modified by Oberley and Spitz (50). SOD activity was determined by the degree of inhibition of the reaction between superoxide radicals, produced by a hypoxanthine-xanthine oxidase system, and nitroblue tetrazolium.

**Adhesion molecule assessment.** sP-selectin and sE-selectin were assessed by ELISA according to the manufacturer's instructions (Diacclone Systems, Besançon, France).

### Statistical Methods

The results are presented as mean  $\pm$  SD. Anthropometric and hematologic characteristics were compared using a two-way ANOVA with Fisher least significant difference (LSD) post hoc. The data related to oxidative stress markers and antioxidants were compared between groups using a two-way repeated-measures ANOVA with Fisher LSD post hoc. Pearson's coefficient correlations were used to determine the associations between markers of oxidative stress and NOx, nitrotyrosine and adhesion markers, respectively. Statistical significance was determined by a *P* value of  $<0.05$ . Analyses were conducted using Statistica (version 8.0, Statsoft, Tulsa, OK).

## RESULTS

### Anthropometric and Hematologic Characteristics

Data for anthropometric, hematologic, and training measurements are detailed in Table 1. Compared with the untrained subjects, the exercise trained group had a significantly higher absolute and relative MAP ( $169 \pm 50$  vs.  $214 \pm 34$  W, *P* = 0.002 and  $2.78 \pm 0.4$  vs.  $3.17 \pm 0.5$  W/kg, *P* = 0.006, for U and T, respectively). Furthermore, there is no differences in absolute or relative MAP among the U and T subgroups, i.e., between U-SCT and U-CON (nonsignificant: NS) and between T-SCT and T-CON (NS). There were no significant differences in %HbS between U-SCT and T-SCT. Whereas no significant differences appeared in age, RBC count, or maximal heart rate among the four groups, U-SCT was taller and U-CON was lighter than the other three groups (*P*  $< 0.05$ ). T-SCT subjects had a significantly higher platelet count than U-SCT and U-CON (see Table 1).

### Oxidative Stress Markers at Baseline and After Maximal Exercise

**AOPP.** AOPP concentrations were not different among the four groups at baseline (NS) but were significantly higher at  $T_{ex}$  than at baseline when the four groups were pooled (*P*  $< 0.001$ ; Table 2). Furthermore, AOPP concentrations were significantly higher in U-SCT than in the three other groups (training  $\times$  hemoglobin crossed effect, *P*  $< 0.05$ ).

**MDA.** At baseline, trained subjects had higher levels of MDA than untrained subjects (*P* = 0.014), whereas there were no differences between SCT carriers and CON subjects. MDA concentrations were significantly increased at  $T_{ex}$ ,  $T_{1h}$ , and  $T_{2h}$  compared with baseline in U-SCT subjects, whereas they were

decreased at  $T_{1h}$ ,  $T_{2h}$ , and  $T_{24h}$  in trained subjects (Table 2). The percentage increase from baseline was significantly higher in U-SCT than the three other groups at  $T_{ex}$ ,  $T_{1h}$ ,  $T_{2h}$ , and  $T_{24h}$  (Fig. 1).

**Protein carbonyl.** There was no difference in protein carbonyl content among groups at baseline (NS). Protein carbonyl was significantly higher in all four groups at  $T_{ex}$  compared with baseline (U-CON: +117%, *P* = 0.0002; U-SCT: +124%, *P*  $< 0.0001$ ; T-CON: +77%, *P*  $< 0.0001$ ; T-SCT: +71%, *P* = 0.0005). U-SCT protein carbonyl concentrations were significantly higher than in the other three groups at  $T_{ex}$  (*P* = 0.003 vs. T-CON; *P* = 0.036 vs. U-CON; and *P* = 0.005 vs. T-SCT). Protein carbonyl levels at  $T_{1h}$ ,  $T_{2h}$ , and  $T_{24h}$  were not significantly different from baseline values regardless of the group (Table 2).

**Nitrotyrosine.** Nitrotyrosine levels were not different at baseline among the four groups (NS). An overall training effect (ANOVA trained vs. untrained independently to time point) was observed with higher nitrotyrosine concentrations in untrained subjects compared with their trained counterparts (*P* = 0.01). U-SCT was the only group with a significant increase in nitrotyrosine at  $T_{ex}$  compared with base (*P* = 0.001). Thus U-SCT had higher nitrotyrosine concentrations at  $T_{ex}$  than the other three groups (*P* = 0.048 vs. U-CON; *P*  $< 0.0001$  vs. T-CON; and *P* = 0.003 vs. T-SCT). At  $T_{1h}$ , U-CON, U-SCT, and T-CON exhibited higher nitrotyrosine concentrations than at baseline (Table 2).

### Antioxidant Markers at Baseline and After Maximal Exercise

**SOD.** No significant inter-group difference was observed in baseline SOD activity. Compared with baseline, a significant increase of SOD activity was observed at  $T_{ex}$  (*P*  $< 0.0001$ ) and  $T_{1h}$  (*P* = 0.002) in trained subjects, whereas no significant variations were observed in their untrained counterparts (Table 3). Furthermore, SOD activity was significantly higher in the trained subjects than in the untrained ones at  $T_{ex}$  (*P* = 0.015; Fig. 2).

**Catalase.** A training effect was observed at baseline with significantly higher catalase activities in trained subjects than their untrained counterparts (*P*  $< 0.001$ ). Trained subjects expressed lower activities of catalase at  $T_{ex}$  (*P*  $< 0.001$ ),  $T_{2h}$  (*P*  $< 0.001$ ) and  $T_{24h}$  (*P*  $< 0.001$ ) than at baseline (Table 3).

**GPX.** No significant inter-group differences were observed at baseline for GPX activity. Regardless of the training or

Table 1. Anthropometric, hematologic, and training measurements of the study population

	Untrained		Trained	
	CON	SCT	CON	SCT
%HbS	N/A	36.2 $\pm$ 3.1	N/A	33.2 $\pm$ 3.2
$\alpha$ -Thal	N/A	3/8	N/A	7/10
Age, yr	22.7 $\pm$ 1.8	23.5 $\pm$ 3.0	24.6 $\pm$ 1.4	23.10 $\pm$ 2.3
Height, cm	169.2 $\pm$ 3.8*	178.0 $\pm$ 4.4	173.7 $\pm$ 5.5*	172.1 $\pm$ 3.1*
Weight, kg	60.1 $\pm$ 5.7	69.5 $\pm$ 5.5†	69.2 $\pm$ 4.8†	65.6 $\pm$ 6.1†
RBC	5.2 $\pm$ 0.7	5.3 $\pm$ 0.5	5.1 $\pm$ 0.1	5.5 $\pm$ 0.2
Platelets	164.1 $\pm$ 81.0‡	172.7 $\pm$ 82.5‡	206.6 $\pm$ 95.2	266.9 $\pm$ 54.7
MAP, W	154.1 $\pm$ 16.7‡	190.4 $\pm$ 11.5‡	214.6 $\pm$ 11.3	212.5 $\pm$ 10.4
Max HR, beats/min	185 $\pm$ 5	183 $\pm$ 4	174 $\pm$ 3	189 $\pm$ 4
Relative MAP, W/kg	2.81 $\pm$ 0.36‡	2.73 $\pm$ 0.35‡	3.11 $\pm$ 0.53	3.24 $\pm$ 0.43

Values are presented as means  $\pm$  SD. CON, healthy subjects; SCT, carriers of sickle cell trait; MAP, maximal aerobic power; %HbS, percent of S hemoglobin. \*Significant difference compared with untrained (U)-SCT (*P*  $< 0.05$ ); †significant difference compared to U-CON (*P*  $< 0.05$ ); ‡significant difference compared to trained subjects (CON and SCT, *P*  $< 0.05$ ).

Table 2. Plasma AOPP, MDA, nitrotyrosine, and protein carbonyl at Base, immediately after a maximal  $T_{ex}$ , and during  $T_{1h}$ ,  $T_{2h}$ ,  $T_{24h}$  in U-CON, U-SCT, T-CON, and T-SCT

	Untrained		Trained		Time Effect
	CON	SCT	CON	SCT	
AOPP, $\mu$ M					
Base	61.2 $\pm$ 24.7	78.7 $\pm$ 53.6	80.9 $\pm$ 48.5	64.4 $\pm$ 16.5	
$T_{ex}$	127.7 $\pm$ 49.6	214.0 $\pm$ 136.9	110.4 $\pm$ 66.9	123.7 $\pm$ 65.4	a
$T_{1h}$	73.4 $\pm$ 59.3	125.8 $\pm$ 81.6	76.9 $\pm$ 54.5	57.4 $\pm$ 49.4	
$T_{2h}$	99.5 $\pm$ 87.6	136.5 $\pm$ 87.3	69.9 $\pm$ 54.1	88.3 $\pm$ 64.1	
$T_{24h}$	86.0 $\pm$ 30.7	124.2 $\pm$ 96.6	131.3 $\pm$ 75.5	125.6 $\pm$ 69.2	a
Hb $\times$ training effect			e		
MDA, $\mu$ M					
Base	23.4 $\pm$ 2.0	20.5 $\pm$ 6.2	27.4 $\pm$ 6.2 <sup>f</sup>	27.3 $\pm$ 6.5 <sup>f</sup>	
$T_{ex}$	24.1 $\pm$ 5.5	32.1 $\pm$ 9.3 <sup>a</sup>	27.2 $\pm$ 6.6	31.3 $\pm$ 5.2	
$T_{1h}$	25.2 $\pm$ 4.4	29.4 $\pm$ 5.1 <sup>a</sup>	19.8 $\pm$ 5.6 <sup>a,c</sup>	23.7 $\pm$ 5.2 <sup>a,c</sup>	
$T_{2h}$	25.4 $\pm$ 5.4	28.1 $\pm$ 6.5 <sup>a</sup>	23.0 $\pm$ 4.1 <sup>a,c</sup>	22.7 $\pm$ 4.3 <sup>a,c</sup>	
$T_{24h}$	22.7 $\pm$ 2.0	26.4 $\pm$ 5.2	23.2 $\pm$ 3.8 <sup>a,c</sup>	21.3 $\pm$ 5.9 <sup>a,c</sup>	
Protein carbonyl, $\mu$ M					
Base	50.5 $\pm$ 12.0	49.2 $\pm$ 11.4	46.8 $\pm$ 14.4	51.8 $\pm$ 10.3	
$T_{ex}$	89.5 $\pm$ 12.0 <sup>f</sup>	111.4 $\pm$ 36.6	81.6 $\pm$ 16.0 <sup>f</sup>	84.8 $\pm$ 25.0 <sup>f</sup>	a
$T_{1h}$	40.8 $\pm$ 21.9	53.6 $\pm$ 21.3	62.6 $\pm$ 19.3	52.8 $\pm$ 15.8	
$T_{2h}$	36.3 $\pm$ 6.9	43.5 $\pm$ 9.6	52.5 $\pm$ 15.6	39.8 $\pm$ 11.6	
$T_{24h}$	37.1 $\pm$ 7.4	46.7 $\pm$ 18.4	46.2 $\pm$ 13.8	41.8 $\pm$ 10.3	
Nitrotyrosine, nM					
Base	82.8 $\pm$ 28.7	67.6 $\pm$ 20.8	65.4 $\pm$ 21.3	95.2 $\pm$ 29.4	
$T_{ex}$	94.3 $\pm$ 38.2	132.7 $\pm$ 27.7 <sup>a,c</sup>	97.1 $\pm$ 39.1	75.1 $\pm$ 51.2	
$T_{1h}$	130.5 $\pm$ 22.3 <sup>a,c</sup>	115.6 $\pm$ 32.9 <sup>a</sup>	104.9 $\pm$ 24.4 <sup>a</sup>	92.0 $\pm$ 27.0	
$T_{2h}$	102.1 $\pm$ 27.5	95.6 $\pm$ 43.4	97.3 $\pm$ 34.3	80.0 $\pm$ 30.1	
$T_{24h}$	76.7 $\pm$ 25.1	83.4 $\pm$ 37.0	47.0 $\pm$ 29.7	52.0 $\pm$ 29.8	c,d
Training effect			g	g	

Values are presented as means  $\pm$  SD. AOPP, advanced oxidation protein products; MDA, malondialdehyde. <sup>a</sup>Significant difference compared with BASE; <sup>b</sup>significant difference compared with the other times; <sup>c</sup>significant difference compared with  $T_{ex}$ ; <sup>d</sup>significant difference compared with  $T_{1h}$  and  $T_{2h}$ ; <sup>e</sup>significant difference compared with the 3 other groups; <sup>f</sup>significant difference compared with U-SCT ( $P < 0.05$ ); <sup>g</sup>significant difference compared with untrained subjects ( $P < 0.05$ ).

hemoglobin status, GPX was significantly higher at  $T_{ex}$ ,  $T_{1h}$ , and  $T_{2h}$  compared with baseline (baseline:  $46.3 \pm 18.8$  vs.  $T_{ex}$ :  $111.6 \pm 31.7$ ,  $P < 0.0001$ , vs.  $T_{1h}$ :  $102.9 \pm 21.6$ ,  $P < 0.0001$ , and vs.  $T_{2h}$ :  $77.9 \pm 21.6$ ,  $P < 0.0001$ ; 4 groups pooled). At  $T_{1h}$  GPX was significantly higher in the trained subjects than in

their untrained counterparts ( $112.0 \pm 14.7$  vs.  $87.7 \pm 9.5$ , respectively,  $P = 0.041$ ; Table 3).

*NOx*. No significant inter-group difference was observed in baseline NOx. NOx was significantly higher in trained subjects, whatever their hemoglobin status (i.e., T-SCT or T-CON)

Fig. 1. Effect of a maximal exercise test on the plasma malondialdehyde (MDA) in trained sickle cell trait carriers and controls (T-SCT and T-CON) and untrained (U-SCT and U-CON) subjects compared with baseline (Base) at the end of exercise ( $T_{ex}$ ), and during recovery ( $T_{1h}$ ,  $T_{2h}$ ,  $T_{24h}$ ). Values are presented as means  $\pm$  SD. §Significant difference from other 3 groups ( $P < 0.05$ ).

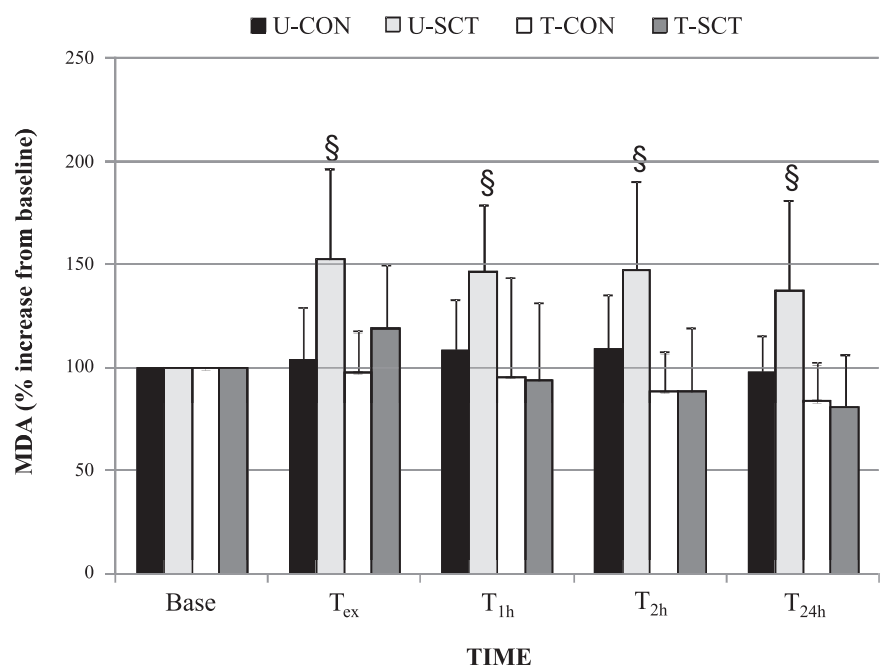


Table 3. Plasma anti-oxidant enzyme activities and NOx at Base, immediately after a maximal exercise test ( $T_{ex}$ ), and during recovery ( $T_{1h}$ ,  $T_{2h}$ ,  $T_{24h}$ ) in U-CON, U-SCT, T-CON, and T-SCT

	Untrained		Trained		Time × Training Effect
	CON	SCT	CON	SCT	
SOD, $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$					
Base	5.6 ± 2.0	5.0 ± 1.2	3.5 ± 2.3	3.4 ± 1.4	
$T_{ex}$	6.0 ± 1.3	4.3 ± 2.5	6.5 ± 2.7*	8.7 ± 7.7*	†
$T_{1h}$	5.7 ± 1.4	7.8 ± 1.2	5.9 ± 1.9*	6.3 ± 1.4*	
$T_{2h}$	5.8 ± 3.4	5.3 ± 1.9	4.8 ± 1.9	4.2 ± 1.4	
$T_{24h}$	5.1 ± 1.5	5.0 ± 1.8	5.0 ± 2.0	4.0 ± 1.7	
Catalase, $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$					
Base	3.8 ± 1.0	4.0 ± 1.8	5.0 ± 0.9	6.1 ± 1.6	†
$T_{ex}$	3.4 ± 0.8	4.3 ± 1.5	3.5 ± 1.6*	4.4 ± 1.2*	
$T_{1h}$	4.6 ± 0.8	4.3 ± 1.2	4.6 ± 1.7	5.1 ± 1.1	
$T_{2h}$	4.1 ± 1.1	3.7 ± 1.1	3.9 ± 1.0*	3.7 ± 1.2*	
$T_{24h}$	3.6 ± 0.6	3.5 ± 0.6	3.5 ± 0.8*	3.8 ± 0.5*	
GPX, $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$					
Base	28.1 ± 2.6	37.8 ± 19.8	54.9 ± 25.6	54.0 ± 20.7	
$T_{ex}$	117.5 ± 31.6*	100.0 ± 36.2*	126.5 ± 8.4*	104.4 ± 38.2*	†
$T_{1h}$	92.3 ± 7.9*	83.1 ± 16.1*	122.9 ± 9.2*	104.8 ± 19.7*	
$T_{2h}$	82.0 ± 22.1*	68.5 ± 19.0*	88.8 ± 26.0*	73.2 ± 17.2*	
$T_{24h}$	54.9 ± 32.5	60.3 ± 11.3	29.3 ± 2.9	54.9 ± 24.0	
NOx, $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$					
Base	20.5 ± 2.9	19.7 ± 6.9	22.0 ± 5.9	19.8 ± 3.1	
$T_{ex}$	20.6 ± 3.6	14.6 ± 7.0	26.6 ± 8.0*	28.8 ± 11.4*	†
$T_{1h}$	20.9 ± 6.2	22.8 ± 18.0	18.5 ± 9.1	21.5 ± 9.3	
$T_{2h}$	24.0 ± 10.7	36.1 ± 14.5*‡	21.2 ± 7.7	19.7 ± 7.6	
$T_{24h}$	20.8 ± 7.6	20.5 ± 10.0	21.5 ± 9.1	19.9 ± 6.7	

Values are presented as means ± SD. SOD, superoxide dismutase; NOx, nitric oxide metabolites; GPX, glutathione peroxidase. \*Significant difference compared with BASE ( $P < 0.05$ ); †significant difference compared with untrained ( $P < 0.05$ ); ‡significant difference compared to the three other groups ( $P < 0.05$ ).

at  $T_{ex}$  compared with baseline ( $P = 0.037$ ), whereas NOx remained unchanged in untrained subjects. Consequently, trained subjects had significantly higher NOx values than untrained subjects at  $T_{ex}$  ( $P = 0.001$ ). Moreover, NOx in U-SCT significantly increased at  $T_{2h}$  compared with baseline ( $P = 0.0005$ ) and was significantly higher than the three other groups ( $P = 0.017$  vs. U-CON;  $P = 0.002$  vs. T-CON, and  $P = 0.006$  vs. T-SCT).

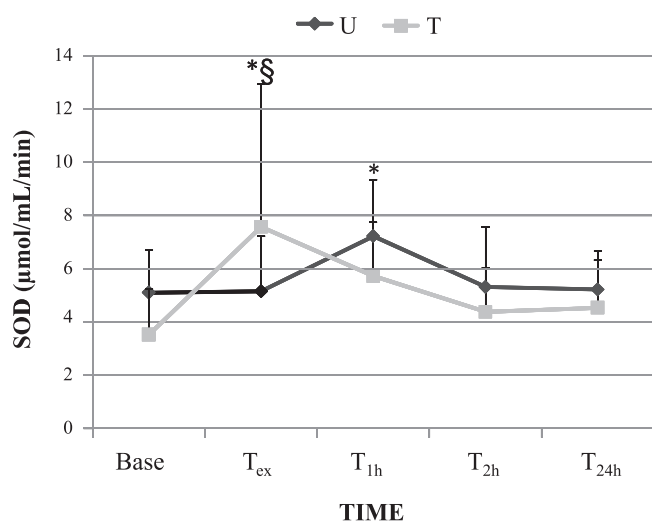


Fig. 2. Effects of a maximal exercise test on the plasma activity of superoxide dismutase (SOD) in untrained (U) or trained (T) subjects at Base, at  $T_{ex}$ , and  $T_{1h}$ ,  $T_{2h}$ , and  $T_{24h}$ . Values represented as means ± SD. \*Significant difference between exercise and Base ( $P < 0.003$ ); §Significant difference between U and T at  $T_{ex}$  ( $P = 0.016$ ).

### Adhesion Molecules

To better understand the correlations between oxidative stress and adhesion molecules, the adhesion data previously presented by Aufradet et al. (3) are summarized in this paragraph. Briefly, basal plasma concentrations of sP-selectin and sE-selectin were not statistically different among the four groups. Plasma sE-selectin significantly increased in all groups at the end of the exercise compared with baseline levels and returned to baseline value 1 h after the end of exercise ( $T_{1h}$ ). Although incremental exercise did not statistically modulate sP-selectin concentrations in T subjects, a significant increase in these concentrations was measured in their untrained counterparts between Base and  $T_{ex}$ . These concentrations returned to basal values 1 h after the end of exercise.

### Correlations

Significant correlations were observed between markers of oxidative stress, nitric oxide, and markers of adhesion. The correlations on the pooled subjects are presented in Table 4. We also found significant relationships between changes (Base vs.  $T_{ex}$ ,  $T_{1h}$ , or  $T_{2h}$ ) in oxidative stress and sE- and sP-selectins or NO metabolism (Table 4). Finally, percentage of HbS was negatively correlated with the NOx increase between baseline and  $T_{ex}$  ( $r = -0.59$ ,  $P = 0.021$ ), i.e., the more the HbS content, the lower the increase in NOx in response to exercise.

### DISCUSSION

The aim of this study was to investigate the impact of regular physical activity on plasma markers of oxidative stress in SCT



Table 4. Correlations between oxidative stress and adhesion markers (pooled subjects)

Variables	Timepoint	Pearson's Correlation	P Value
NOx with			
AOPP	Baseline	-0.6988	0.000
GPX	Baseline vs. T <sub>1h</sub>	0.4093	0.031
MDA	Baseline vs. Ex	-0.3968	0.036
AOPP	Baseline vs. T <sub>1h</sub>	-0.4762	0.007
Nitrotyrosine with			
Catalase	Exercise	-0.5694	0.002
Carbonyl	Baseline vs. Ex	0.5787	0.002
AOPP	Baseline vs. T <sub>2h</sub>	0.5671	0.004
E-selectin with			
Catalase	Exercise	-0.3977	0.020
MDA	Baseline vs. T <sub>1h</sub>	0.3615	0.050
P-selectin with			
AOPP	Exercise	0.4274	0.008
Carbonyl	T <sub>2h</sub>	0.3459	0.039
AOPP	Baseline vs. Ex	0.3591	0.029

Values are presented as Pearson's correlation coefficients and corresponding *P* values.

carriers. In support of our hypotheses, the results of the present study demonstrated that regular physical activity 1) blunted the increase in oxidative stress and the decrease in NO metabolism observed in SCT and 2) upregulated the antioxidant enzymes activities (SOD and GPX) in response to exercise in SCT. In addition, we reported a strong association between changes in various oxidative stress markers in response to exercise and the corresponding changes in sP- and sE-selectins. Although no causality can be assumed, these correlations strengthen the hypothesis that ROS may be involved in endothelial adhesion in HbS carriers.

#### General Considerations on the Effects of Hemoglobin and Training Status on Hematologic and Training Measurements

Maximal aerobic power was similar between SCT and control subjects, as supported by previous studies. Conversely, MAP was higher in the trained subjects compared with the untrained subjects. In agreement with several authors (15, 64), we found that trained subjects had a higher platelet count than untrained subjects. The T-SCT subjects had nonsignificantly higher platelet counts than the other three groups. Although an increased platelet count is a risk factor for vaso-occlusive crises in SCD (62), this increase was not significant and is probably due to a training effect rather than a hemoglobin effect.

#### General Considerations on the Effects of Maximal Exercise and Training on Oxidative Stress and Antioxidant Markers in Healthy Subjects

Regarding the results obtained in CON, the present study is in complete agreement with data reported in the literature. First, the overall increase in various markers of oxidative stress observed in response to the maximal exercise test is consistent with the results of previous studies (7, 41). Second, strong evidence indicates that exercise training can have a beneficial effect on oxidative stress (21, 28, 41). As supported by Miyazaki et al. (46), trained subjects have an improved ability to endure the stress of a maximal exercise bout. A lower level of oxidative stress was also evident in the trained subjects of our

study. In fact, T-CON subjects had a reduced increase in all markers of oxidative stress in response to the maximal exercise test compared with their untrained counterparts.

It has been reliably shown that individuals partaking in exercise training have higher levels of antioxidant enzymes and exhibit greater protection against exercise-induced oxidative stress (27, 61). The reactive oxygen species produced during exercise training can result in a stimulation of antioxidant defense (39, 57). The exercise-trained subjects in our study produced a significant increase in SOD and GPX, which was accompanied by lower oxidative stress. This decrease in oxidative stress likely occurs due to the improved antioxidant adaptation. Our results are in agreement with several other studies that found an improved antioxidant response relating to exercise training (25, 53).

Our study also shows higher baseline levels of MDA in our trained subjects (16, 21). The high level of resting MDA in trained subjects could be related to the ability of lipid peroxidation products to regulate and modulate cell signaling and gene expression (49). Oxidized lipids can interact with receptors that are known to activate antioxidant enzymes such as catalase and SOD (22) and can improve cellular tolerance against pro-oxidant attacks (49). It is therefore possible that higher levels of lipid peroxidation products, such as MDA, are needed to maintain antioxidant status, such as we saw for catalase and GPX (even if nonsignificant).

#### Exercise Training Blunts Oxidative Stress in SCT Carriers

HbS, which represents ~80% of total hemoglobin in SCD patients, can generate a twofold greater quantity of ROS than HbA (2, 23). In SCT carriers, in whom HbS represents ~40% of total hemoglobin, we found that oxidative stress varied little at baseline from healthy subjects. This is in agreement with other studies that found no difference between SCT carriers and healthy subjects at baseline (3, 12, 67). However, in response to acute exercise, SCT carriers can experience higher oxidative stress (12, 36). Our study reinforces this idea as it shows that U-SCT had a significantly greater increase in MDA and AOPP in response to a maximal exercise bout than the healthy subjects. The increased morbidity or mortality in SCT could be attributed to higher levels of oxidative stress (32).

However, the main finding of the present study is that the well-known benefits of exercise training in healthy subjects are well translated in the SCT subjects. In response to the maximal exercise test, T-SCT subjects 1) exhibited lower AOPP, MDA, nitrotyrosine, and protein carbonyl levels than U-SCT, and 2) responded similarly to the T-CON subjects with regard to the protein carbonyl, MDA, and AOPP. In addition to the fact that these results mimic those already seen in many other disease, such as cardiovascular disease (17), diabetes (56), and menopause (53), they emphasize the beneficial effects of exercise training on oxidative stress in SCT carriers.

#### Antioxidant Defense System is Improved in Exercise-Trained SCT Carriers

The improvement in the antioxidants defense system seen in exercise training is due to a ROS-generated stimulation triggering antioxidant enzyme activation (39, 57). The maximal exercise test that normally increases oxidative stress was met by a concomitant increase in antioxidant enzyme defenses, in

all but the U-SCT carriers. Repeated habitual exercise can cause antioxidants to increase in response to the repeated oxidative stress. This has been supported *in vitro* where the treatment of pro-oxidants stimulated a significant increase in antioxidants (18). Interestingly, this did not occur in U-SCT subjects, as they had a delayed response of SOD and a reversed response of catalase. This supports studies that showed levels of SOD and catalase decrease in proportion to disease severity (13, 59). The response to SOD and catalase could indicate an impaired antioxidant status, meaning a reduced ability to buffer the excess oxidative stress.

The trait by itself can result in an increase in oxidative stress and impairment in NO, and when paired with an acute stress such as a maximal exercise test, this response is augmented, as observed with U-SCT. However, exercise training is able to stimulate antioxidants to respond to the overload of oxidative stress. This improved response to oxidative stress allows SCT carriers to respond similarly to CON subjects, as demonstrated by our study. This indicates that, as far as oxidative stress is concerned, training can override the negative consequence of SCT, rendering these subjects as controls.

### Nitric Oxide

Nitric oxide, an important mediator of vasodilation, has been shown to be amplified in response to exercise training (21, 40, 41, 44). The present study supports these findings, as the SCT and CON trained subjects significantly increased NOx immediately after the exercise test, whereas the untrained subjects slightly decreased. Our study suggests that exercise training may inhibit NO degradation through an upregulation of antioxidants and a decrease in ROS. We found that the percent change (% $\Delta$ ) of NOx levels were positively correlated with GPX levels at  $T_{1h}$  and were negatively correlated with MDA levels (% $\Delta$ ) at  $T_{ex}$  and AOPP levels (% $\Delta$ ) at  $T_{1h}$ . Nitrotyrosine, which represents the nitration activity of peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) produced through the reaction of NO and superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), tended to increase in the untrained subjects compared with the trained subjects ( $P = 0.055$ ) and was significantly higher in the U-SCT carriers compared with T-SCT carriers ( $P = 0.003$ ). This is in accordance with other studies that found a decrease in nitrotyrosine levels in exercise-trained subjects (37, 53). Although our correlations do not suggest causality, these results 1) could indicate a reduced O<sub>2</sub><sup>-</sup> production and 2) suggest an increase in NO bioavailability as a result of reduced oxidative stress (21, 53) in trained SCT carriers than in their untrained counterparts.

The improvement in NOx levels in response to physical activity level is reflected in the SCT subjects as well. T-SCT subjects had a similar improvement in NOx response as the T-CON subjects. Interestingly, the U-SCT had a delayed peak in NOx at  $T_{2h}$ , which was associated with an elevation in oxidative stress. These results emphasize the overall impairment in response to an exhaustive exercise bout. An impaired NO bioavailability is associated with an increase in ROS, hemolysis (58), eNOS uncoupling due to hemolysis-induced arginase, and cell adhesion (35). Because NO has potent anti-adhesive properties which downregulate adhesion molecule expression maintaining proper endothelial cell function and vasodilation, a NO impairment can increase cell adhesion (35). This is supported by Aufradet et al. (3), who found a

significant increase in VCAM-1 levels in untrained SCT subjects immediately after exercise (U-SCT:  $1,738 \pm 98$  ng/ml vs. T-SCT:  $1,248 \pm 131$  ng/ml;  $P < .05$ )—the exact same time point as the decreased NOx response in U-SCT carriers. As ROS markers were positively correlated with sP- and sE-selectins and negatively correlated with antioxidant markers, these data suggest that a NO-induced increase in oxidative stress could exacerbate endothelial and/or platelets activation. However, it should be noted that there were no differences between sP-selectin and sE-selectin in the different subjects. Therefore, the training-induced decrease in oxidative stress and increase in NO bioavailability could be favorable for the health of SCT carriers involved in regular exercise by dampening risk of sickling, morbidity, and mortality.

This study suggests that exercise training can improve the response to oxidative stress in SCT carriers. However, at this time, most studies involving different intensities and durations of exercise have found conflicting results in relation to coagulation activity, RBC deformability, inflammation, and adhesion in SCT [see review by Connes et al. (11)]. However, these events may be compounded by other factors such as heat stress, dehydration, and poor physical conditioning. Baskurt and Meiselman (4), suggested that exercise utilizes the vascular autoregulatory reserve to maintain homeostasis, yet even minor vascular and hemorheologic perturbations in SCT carriers may be augmented in response to exercise.

### Conclusion

In conclusion, we found that although there is relatively little difference between SCT carriers and healthy subjects at rest, a maximal exercise test can inundate the oxidative stress response in U-SCT subjects. We also found that training can reduce the oxidative stress in response to exercise of SCT carriers. Training improves antioxidant and NO availability that can thereafter regulate ROS production. These effects could result in decreased endothelial activation. This study does not allow us to make definitive conclusions about the direct causality between exercise training and oxidative stress and NO improvements. Further information could be concluded using longitudinal studies which focus on mechanistic pathways and more directly evaluate endothelial dysfunction using methods such as flow mediated dilation.

Finally, we believe that the beneficial effects seen in SCT carriers in this study could translate well in SCD patients as well. Although there are large clinical differences between SCT and SCD, both are overwhelmed by an increase in oxidative stress. Because we have shown that exercise training can decrease oxidative stress and improve antioxidant and nitric oxide responses, we believe that the complications known in SCD, such as vaso-occlusion crisis, that are linked to oxidative stress (26, 38) could potentially be reduced. Therefore, an adapted exercise training program could be a relevant option to control the cardiovascular complications of this pathology.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mrs. Vivianne Banimbek, Dr. Dieudonné Wouassi, Mrs. Gaëlle Lepape, Pr. Christophe Nouedoui, Mrs. Philippe Stofft, and François-Xavier Owona for their helpful assistance, and the general direction of the Central Hospital of Yaounde for its hospitality.

## GRANTS

This study was supported by grants from the Ambassade de France au Cameroun, in Yaounde. This work was also completed thanks to the financial and logistic support of the Cameroonian Ministries of Public Health and of Higher Education.

## DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: E.N.C., C.M., C.F., L.F., E.A., H.D., A.F., L.A.M., and V.P. performed experiments; E.N.C., C.M., and V.P. analyzed data; E.N.C. interpreted results of experiments; E.N.C. prepared figures; E.N.C., C.M., and L.A.M. drafted manuscript; E.N.C., C.M., C.F., L.F., H.D., E.C.-S., P.T., L.A.M., and V.P. edited and revised manuscript; S.O.-E., L.A.M., and V.P. conception and design of research; L.A.M. and V.P. approved final version of manuscript.

## REFERENCES

- Akinsheye I, Klings ES. Sickle cell anemia and vascular dysfunction: the nitric oxide connection. *J Cell Physiol* 224: 620–625, 2010.
- Amer J, Ghoti H, Rachmilewitz E, Koren A, Levin C, Fibach E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *Br J Haematol* 132: 108–113, 2006.
- Aufradet E, Monchanin G, Oyono-Engelle S, Feasson L, Messonnier L, Francina A, Bezin L, Serpero LD, Gozal D, Dodogba M, Wouassi D, Banimbeck V, Djoda B, Thiriet P, Martin C. Habitual physical activity and endothelial activation in sickle cell trait carriers. *Med Sci Sports Exerc* 42: 1987–1994, 2010.
- Baskurt OK, Meiselman HJ, Bergeron MF. Point: Sickle cell trait should be considered asymptomatic and as a benign condition during physical activity. *J Appl Physiol* 103: 2142, 2007.
- Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44: 276–287, 1971.
- Bergeron MF, Cannon JG, Hall EL, Kutlar A. Erythrocyte sickling during exercise and thermal stress. *Clin J Sport Med* 14: 354–356, 2004.
- Bloomer RJ, Fisher-Wellman KH. Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. *Genet Med* 5: 218–228, 2008.
- Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletion determinants of alpha-thalassemia. *Blood* 95: 360–362, 2000.
- Connes P, Hardy-Dessources MD, Hue O. Counterpoint: Sickle cell trait should not be considered asymptomatic and as a benign condition during physical activity. *J Appl Physiol* 103: 2140–2141, 2007.
- Connes P, Hardy-Dessources MD, Hue O. Counterpoint: Sickle cell trait should not be considered asymptomatic and as a benign condition during physical activity. *J Appl Physiol* 103: 2138–2140, 2007.
- Connes P, Reid H, Hardy-Dessources MD, Morrison E, Hue O. Physiological responses of sickle cell trait carriers during exercise. *Sports Med* 38: 931–946, 2008.
- Das SK, Hinds JE, Hardy RE, Collins JC, Mukherjee S. Effects of physical stress on peroxide scavengers in normal and sickle cell trait erythrocytes. *Free Radic Biol Med* 14: 139–147, 1993.
- Das SK, Nair RC. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. *Br J Haematol* 44: 87–92, 1980.
- Eichner ER. Sickle cell trait in sports. *Curr Sports Med Rep* 9: 347–351, 2010.
- el-Sayed MS. Effects of exercise on blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation. *Sports Med* 22: 282–298, 1996.
- Falone S, Mirabilio A, Pennelli A, Cacchio M, Di Baldassarre A, Gallina S, Passerini A, Amicarelli F. Differential impact of acute bout of exercise on redox- and oxidative damage-related profiles between untrained subjects and amateur runners. *Physiol Res* 59: 953–961, 2010.
- Fearon IM, Faux SP. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. *J Mol Cell Cardiol* 47: 372–381, 2009.
- Franco AA, Odom RS, Rando TA. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 27: 1122–1132, 1999.
- Galiñanes M, Matata BM. Protein nitration is predominantly mediated by a peroxynitrite-dependent pathway in cultured human leucocytes. *Biochem J* 367: 467–473, 2002.
- Le Gallais D, Lonsdorfer J, Bogui P, Fattoum S. Point:Counterpoint: Sickle cell trait should/should not be considered asymptomatic and as a benign condition during physical activity. *J Appl Physiol* 103: 2137–2138, 2007.
- Goto C, Higashi Y, Kimura M, Noma K, Hara K, Nakagawa K, Kawamura M, Chayama K, Yoshizumi M, Nara I. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation* 108: 530–535, 2003.
- Gumieniczek A, Hopkala H, Zabek A. Protective effects of a PPAR-gamma agonist pioglitazone on anti-oxidative system in testis of diabetic rabbits. *Pharmazie* 63: 377–378, 2008.
- Hebbel RP, Eaton JW, Balasingam M, Steinberg MH. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J Clin Invest* 70: 1253–1259, 1982.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73: 411–418, 2009.
- Higuchi M, Cartier LJ, Chen M, Holloszy JO. Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. *J Gerontol* 40: 281–286, 1985.
- Hsu LL, Champion HC, Campbell-Lee SA, Bivalacqua TJ, Mancini EA, Diwan BA, Schimel DM, Cochard AE, Wang X, Schechter AN, Noguchi CT, Gladwin MT. Hemolysis in sickle cell mice causes pulmonary hypertension due to global impairment in nitric oxide bioavailability. *Blood* 109: 3088–3098, 2007.
- Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann NY Acad Sci* 1067: 425–435, 2006.
- Ji LL. Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. *Exerc Sport Sci Rev* 23: 135–166, 1995.
- Johansson LH, Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 174: 331–336, 1988.
- Jones SR, Binder RA, Donowho EM. Sudden death in sickle-cell trait. *N Engl J Med* 282: 323–325, 1970.
- Kark JA, Posey DM, Schumacher HR, Ruehle CJ. Sickle-cell trait as a risk factor for sudden death in physical training. *N Engl J Med* 317: 781–787, 1987.
- Kark JA, Ward FT. Exercise and hemoglobin S. *Semin Hematol* 31: 181–225, 1994.
- Kato GJ, Martyr S, Blackwelder WC, Nichols JS, Coles WA, Hunter LA, Brennan ML, Hazen SL, Gladwin MT. Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *Br J Haematol* 130: 943–953, 2005.
- Kerle KK, Nishimura KD. Exertional collapse and sudden death associated with sickle cell trait. *Mil Med* 161: 766–767, 1996.
- Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9114–9119, 1996.
- Kimmick G, Owen J. Rhabdomyolysis and hemolysis associated with sickle cell trait and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *South Med J* 89: 1097–1098, 1996.
- Kimura H, Kon N, Furukawa S, Mukaida M, Yamakura F, Matsumoto K, Sone H, Murakami-Murofushi K. Effect of endurance exercise training on oxidative stress in spontaneously hypertensive rats (SHR) after emergence of hypertension. *Clin Exp Hypertens* 32: 407–415, 2010.
- Klings ES, Christman BW, McClung J, Stucchi AF, McMahon L, Brauer M, Farber HW. Increased F2 isoprostanes in the acute chest syndrome of sickle cell disease as a marker of oxidative stress. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1248–1252, 2001.
- Knez WL, Coombes JS, Jenkins DG. Ultra-endurance exercise and oxidative damage: implications for cardiovascular health. *Sports Med* 36: 429–441, 2006.
- Kojda G, Hambrecht R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc Res* 67: 187–197, 2005.
- Laufs U, Wassmann S, Czech T, Münzel T, Eisenhauer M, Böhm M, Nickenig G. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial



- dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 809–814, 2005.
42. Lefèvre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousselot D, Cristol JP, Thérond P, Torrelles J. [Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances]. *Ann Biol Clin (Paris)* 56: 305–319, 1998.
  43. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 186: 464–478, 1990.
  44. Matsumoto A, Hirata Y, Momomura S, Fujita H, Yao A, Sata M, Serizawa T. Increased nitric oxide production during exercise. *Lancet* 343: 849–850, 1994.
  45. Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, Moore WM, Currie MG. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem* 214: 11–16, 1993.
  46. Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, Haga S, Ji LL, Ohno H. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol* 84: 1–6, 2001.
  47. Monchanin G, Serpero LD, Connes P, Tripette J, Wouassi D, Bezin L, Francina A, Ngongang J, de la Peña M, Massarelli R, Gozal D, Thiriet P, Martin C. Effects of progressive and maximal exercise on plasma levels of adhesion molecules in athletes with sickle cell trait with or without alpha-thalassemia. *J Appl Physiol* 102: 169–173, 2007.
  48. Monchanin G, Serpero LD, Connes P, Tripette J, Wouassi D, Francina A, Massarelli R, Gozal D, Thiriet P, Martin C. Plasma levels of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in athletes with sickle cell trait with or without alpha-thalassemia during endurance exercise and recovery. *Clin Hemorheol Microcirc* 40: 89–97, 2008.
  49. Niki E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med* 47: 469–484, 2009.
  50. Oberley L, Spitz D. Nitroblue tetrazolium. In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton, FL: CRC, 1985.
  51. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351–358, 1979.
  52. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158–169, 1967.
  53. Pialoux V, Brown AD, Leigh R, Friedenreich CM, Poulin MJ. Effect of cardiorespiratory fitness on vascular regulation and oxidative stress in postmenopausal women. *Hypertension* 54: 1014–1020, 2009.
  54. Pialoux V, Hanly PJ, Foster GE, Brugniaux JV, Beaudin AE, Hartmann SE, Pun M, Duggan CT, Poulin MJ. Effects of exposure to intermittent hypoxia on oxidative stress and acute hypoxic ventilatory response in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 180: 1002–1009, 2009.
  55. Pialoux V, Mounier R, Brown AD, Steinback CD, Rawling JM, Poulin MJ. Relationship between oxidative stress and HIF-1 alpha mRNA during sustained hypoxia in humans. *Free Radic Biol Med* 46: 321–326, 2009.
  56. Qi Z, He J, Zhang Y, Shao Y, Ding S. Exercise training attenuates oxidative stress and decreases p53 protein content in skeletal muscle of type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Free Radic Biol Med* 50: 794–800, 2011.
  57. Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med* 44: 153–159, 2008.
  58. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, Schechter AN, Gladwin MT. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* 8: 1383–1389, 2002.
  59. Schacter L, Warth JA, Gordon EM, Prasad A, Klein BL. Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. *FASEB J* 2: 237–243, 1988.
  60. Sears DA. The morbidity of sickle cell trait: a review of the literature. *Am J Med* 64: 1021–1036, 1978.
  61. Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol* 79: 675–686, 1995.
  62. Shanley LA, Ebeling M, Titus MO. Changes in platelet count as a predictive tool in sickle cell acute vaso-occlusive crises: a pediatric study. *Clin Pediatr (Phila)* 50: 657–661, 2011.
  63. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82: 291–295, 1997.
  64. Singh I, Quinn H, Mok M, Southgate RJ, Turner AH, Li D, Sinclair AJ, Hawley JA. The effect of exercise and training status on platelet activation: Do cocoa polyphenols play a role? *Platelets* 17: 361–367, 2006.
  65. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet* 364: 1343–1360, 2004.
  66. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1005–L1028, 2000.
  67. Tripette J, Connes P, Beltan E, Chalabi T, Marlin L, Chout R, Baskurt OK, Hue O, Hardy-Dessources MD. Red blood cell deformability and aggregation, cell adhesion molecules, oxidative stress and nitric oxide markers after a short term, submaximal, exercise in sickle cell trait carriers. *Clin Hemorheol Microcirc* 45: 39–52, 2010.
  68. Tripette J, Hardy-Dessources MD, Sara F, Montout-Hedreville M, Saint-Martin C, Hue O, Connes P. Does repeated and heavy exercise impair blood rheology in carriers of sickle cell trait? *Clin J Sport Med* 17: 465–470, 2007.
  69. Tsaras G, Owusu-Ansah A, Boateng FO, Amoateng-Adjepong Y. Complications associated with sickle cell trait: a brief narrative review. *Am J Med* 122: 507–512, 2009.
  70. Witko-Sarsat V, Gausson V, Descamps-Latscha B. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? *Kidney Int Suppl* May: S11–S14, 2003.

# Annexe 2

---

## **Efficacité des globules rouges homologues encapsulant de l'inositol hexaphosphate chez les souris transgéniques drépanocytaires**

---

V.Bourgeaux, E.Aufradet, Y.Campion, G.De Souza, F.Horand, A.Bessaad, AM.Chevrier,  
E.Canet-Soulas, Y.Godfrin and C.Martin.

Publié dans *British Journal of Haematology* en 2010.

Volume 157; pages 357-369.

---

## Efficacy of homologous inositol hexaphosphate-loaded red blood cells in sickle transgenic mice

Vanessa Bourgeaux,<sup>1</sup> Emeline Aufradet,<sup>2</sup> Yannick Campion,<sup>1</sup> Geneviève De Souza,<sup>2</sup> Françoise Horand,<sup>1</sup> Amine Bessaad,<sup>2</sup> Anne-Marie Chevrier,<sup>1</sup> Emmanuelle Canet-Soulas,<sup>3</sup> Yann Godfrin,<sup>1,\*</sup> Cyril Martin,<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>ERYTECH Pharma, Lyon, France, <sup>2</sup>EA 647 Centre de Recherche et d'Innovation sur le Sport, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France, <sup>3</sup>INSERM U1060, Laboratoire CarMeN et CENS, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France,

Received 1 December 2011; accepted for publication 14 January 2012

Correspondence: Yann Godfrin, ERYTECH Pharma, 60 Avenue Rockefeller, Lyon, 69008, France.

E-mail: ygodfrin@erytech.com

\*CM and YG have co-directed this work.

### Summary

Patients with sickle cell disease (SCD) can present several severe symptoms during their lifetime, including painful events due to vascular occlusion (VOC). Even though multiple factors are involved in VOC, hypoxia is the most important triggering factor. Inositol hexaphosphate (IHP) reduces the oxygen-haemoglobin affinity thus improving the oxygen release in the blood stream and in the tissues. Thus, IHP-loaded homologous red blood cells (IHP-RBCs) could be able to reduce disorders in SCD. The effectiveness of treatment was assessed in two types of SCD transgenic mice (BERK and SAD). The administration of four repeated injections of IHP-RBCs in BERK mice resulted in an improved survival rate and brain development, prevention of severe anaemia and a greatly lowered risk of VOC. After one injection of IHP-RBCs, SAD mice were subjected to acute hypoxic stress. Analysis of the lungs revealed significantly decreased mRNA levels of molecules involved in intravascular disorders. Our results showed that transfusion of homologous IHP-RBCs, by increasing the oxygen delivery, reduces SCD disorders in sickle transgenic mice.

**Keywords:** erythrocytes, sickle cell disease, blood transfusion, transgenic mice model, oxygen affinity, cellular therapies.

Sickle cell disease (SCD) is a blood disorder characterized by abnormal haemoglobin S (HbS). Under hypoxic conditions, HbS polymerizes inducing distortion of RBCs into rigid sickle-shaped cells. Homozygous SCD patients (SS) may experience painful episodes such as acute chest syndrome (ACS), vaso-occlusion (VOC) or strokes during their lifetime (Stuart & Nagel, 2004; Steinberg, 2008; Rees *et al*, 2010). Blood transfusions are currently the most studied and accepted therapy for those patients. Chronic red blood cell (RBC) exchanges are effective in preventing the recurrence of strokes or VOC (Wayne *et al*, 1993; Pegelow *et al*, 1995; Adams *et al*, 1998; Miller *et al*, 2001; Josephson *et al*, 2007) while simple blood transfusions are usually used in case of severe anaemia or ACS (Hirani *et al*, 2011). For chronic and acute transfusions, the goal is to increase the oxygen carrying capacity and to dilute abnormal SS-RBCs in whole blood.

Hypoxia is a crucial factor in the onset of sickle cell-related events. In VOC processes, complex aggregates of sickled reticulocytes and platelets interact with the endothelium (Conran & Costa, 2009) reducing blood velocity, creating local hypoxia and enhancing sickling. The mechanism is quite similar for ACS. Constriction of pulmonary blood ves-

sels promoted by oxygen deprivation produces sequestration of circulating cellular components (Stuart & Nagel, 2004). As for stroke, although genetic predispositions may place some SCD patients at high risk, cerebral hypoxaemia is recognized as an intermediate risk factor (Kirkham & Hogan, 2004).

One way to provide a substantial oxygen supply for a long period and to boost the effectiveness of existing transfusion therapy could be to transfuse SCD patients with homologous RBCs loaded with Inositol Hexaphosphate (IHP). IHP is an allosteric effector that binds tightly to Hb (1000 times more than the natural effector 2,3-DPG) and reduces Hb affinity for oxygen. IHP-loaded RBCs (IHP-RBCs) have enhanced oxygenation properties. On the contrary to packed normal RBCs, IHP-RBCs, once transfused to patients, should be able to release oxygen more rapidly and more extensively than SS-RBCs, thus preventing sickling. In a previous article, we reported the ability of IHP-RBCs to significantly decrease *in vitro* sickling of RBCs from homozygous SCD patients (Bourgeaux *et al*, 2010). Treatment was seven times more effective than normal RBCs, reducing the proportion of sickled RBCs by 35% when IHP-RBCs were mixed with 50% of patient RBCs.

These encouraging results led us to investigate the potential of IHP-RBCs with *in vivo* studies, under the hypothesis that IHP-RBCs, by inhibiting sickling, may also act on the whole cascade of events leading to VOC (Fig. 1). Among available transgenic mouse models of the disease (Trudel *et al*, 1994; Nagel & Fabry, 2001), BERK and SAD mice were selected. BERK mice, which express exclusively  $\alpha$  and  $\beta$ S human globin chains, exhibit the specific feature of splenomegaly (Pászty *et al*, 1997; Mancini *et al*, 2006) suggesting that this model is more representative of human SCD in childhood. Indeed, SCD children often display hypersplenism and sequestration crisis, requiring them to undergo prophylactic splenectomy, while most of the time adults with SCD show atrophy of the spleen. Because most chronic RBC exchange therapies are performed in children, BERK mice were used to evaluate effectiveness of chronic IHP-RBCs transfusions in the prevention of sickling events. Unlike BERK mice, SAD mice express a very mild pattern of sickle cell syndrome, characterized by sickling but with no evidence of anaemia or exuberant reticulocytosis. However, SAD mice, which are very sensitive to hypoxia/reoxygenation, represent a relevant model for acute sickling events (de Franceschi *et al*, 2003) and thus were used to investigate the effectiveness of a simple transfusion of IHP-RBCs. Both *in vivo* studies showed the potential of IHP-RBCs over conventional transfusion.

## Materials and methods

The Institutional Animal Care and Use Committee of the Rhône-Alpes district of France approved the *in vivo* protocols.

## Preparation of IHP-RBCs and control suspensions

IHP was loaded into murine C57BL/6J or OF1 RBCs (Charles River laboratories, L'Arbresles, France) using the reversible hypotonic lysis method. Briefly, IHP was added to packed RBCs at a final concentration of  $11.5 \pm 1$  mmol/l leading to a suspension of 65% haematocrit (Hct). The poration of RBCs was performed at 2 ml/min against a hypotonic buffer of 80 mosmol/kg running at counter-current (15 ml/min) into the column. The RBCs were then resealed by incubation (10% v:v) in a hypertonic solution (Bourgeaux *et al*, 2010). The final product was re-suspended in decomplexed autologous plasma and adjusted to a haematocrit of 60%. Control RBCs consisted of native C57BL/6J or OF1 RBCs. However, because most transfusion centres use leucoreduced human RBCs with associated 2,3-DPG depletion when transfusing SCD patients, murine control RBCs were further processed with three washes (0.9% NaCl, v:v) for leucocyte removal and  $25 \pm 1$  h incubation at room temperature to allow 2,3-DPG depletion. IHP-RBCs and control RBCs were fluorescently labelled with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE; Invitrogen, Cergy Pontoise, France) to allow traceability of injected cells. Prior to injections, suspensions were diluted to 50% Hct. Methods used to assess entrapped IHP, the oxygen partial pressure required to achieve 50% haemoglobin saturation ( $P_{50}$ ), oxygen saturation at 100 mmHg, Hct and haematological parameters were described previously (Bourgeaux *et al*, 2010).

## Evaluation of RBC half life

IHP-RBCs or control RBCs were administered intravenously in the caudal vein of OF1 mice ( $n = 21$ ) at a dosage of 8 ml/

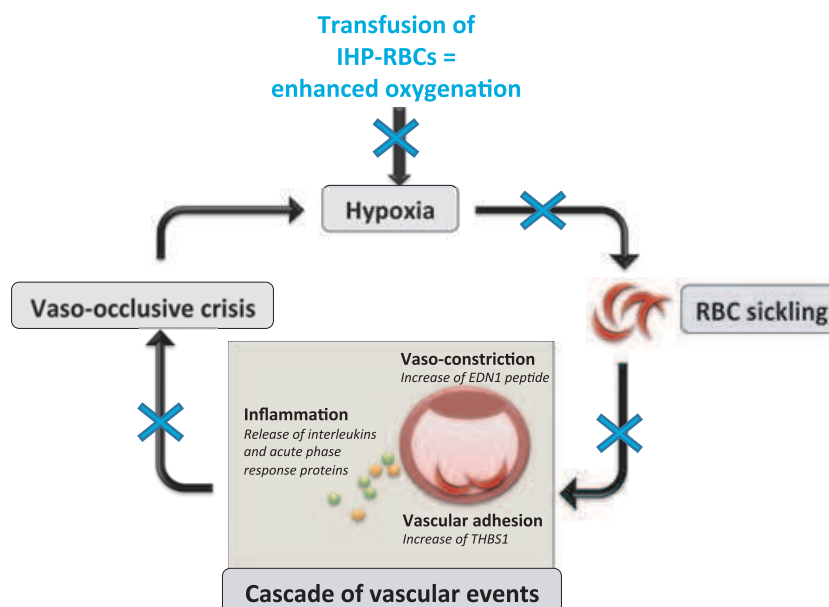


Fig 1. IHP-RBCs as preventive therapy in SCD: mechanism of action. Inositol hexaphosphate-loaded red blood cells (IHP-RBCs) increase oxygen release thus reducing hypoxia. Once transfused, IHP-RBCs provide tissues and SS-RBCs with oxygen, and consequently may reduce intravascular events including adhesion, inflammation and vaso-constriction.

kg body weight. At each time point, ranging from 15 min to 27 days post-transfusion, three mice were sacrificed after blood collection. The proportion of fluorescent RBCs was assessed by flow cytometry (FC500; Beckman Coulter, Paris, France). The 24-h post-transfusion survival was determined taking the 15-min time point as the reference for 100%. The *in vivo* half-life ( $t_{1/2}$ ) was determined using  $t_{1/2} = (\ln 2)/K - 1$ .

#### Study in BERK mice

Progenitor trios were supplied by Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA. Criteria for inclusion of mice in the study were (i) homozygosity for the *Hba* and *Hbb* Knock-out (ii) a positive response to the transgen Tg(Hu-mini-LCR $\alpha 1^{\text{G}\gamma^{\text{A}}\gamma\delta\beta^{\text{S}}}$ ) (iii) and a high reticulocyte count ( $\geq 30\%$ ). Males and females (6–8 weeks old) were divided into three groups: untreated ( $n = 13$ ), control RBCs ( $n = 11$ ) and IHP-RBCs ( $n = 10$ ). Chronic RBC exchanges scheduled every 2 weeks ( $T_0$ ,  $T_2$ ,  $T_4$ ,  $T_6$ ) were performed retro-orbitally (8 ml/kg of body weight) with isovolemic compensatory blood collection. Seven weeks after the first injection, surviving mice were challenged with hypoxia (8%O<sub>2</sub>, 2 h) in a chamber (Biospherix, Redfield, NJ, USA) regulated by addition of nitrogen (Linde Gas, Saint Priest, France) automatically controlled by the Pro-Ox system (Biospherix). After 15 min of reoxygenation, mice were anesthetized for whole blood collection, then the mice were sacrificed. Lungs, spleen, liver, heart and brain were rapidly dissected, weighed and stored under appropriate conditions for organ analysis. One slide of each tissue was stained with haematoxylin and eosin (H&E) or Masson trichrome. Histological analysis was performed under a light microscope (Diaplan; Leitz, Nanterre, France); immunostaining of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1) in the lung was performed using a rat monoclonal anti-VCAM1 antibody diluted at 1/40 (MCA2297; AbD Serotec, Oxford, UK). Hb, Hct and platelets in whole blood were measured using an ABX automat (Horiba, Montpellier, France). The proportion of reticulocytes was assessed by flow cytometry using thiazole-orange staining (BD Retic reagent; BD Pharmingen, Oxford, UK). Molecular detection in the plasma was performed using commercial kits: serum amyloid protein (SAP; Gentaur, Kampenhout, Belgium), mouse thrombospondin-1 (THBS1; Cusabio, Newark, DE, USA), Endothelin-1 (EDN1; Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) and secretory phospholipase A2 (sPLA2; USCN Inc, Wuhan, China).

#### Study in SAD mice

Transgenic Hb<sup>S/S</sup> SAD mice (De Paepe & Trudel, 1994; Trudel *et al*, 1994) (males and females, 6–8 weeks old) included in the protocol were divided into three groups: untreated ( $n = 9$ ), control RBCs ( $n = 10$ ) and IHP-RBCs ( $n = 15$ ).

Injection of 28 ml/kg was performed retro-orbitally with compensatory blood collection of 16 ml/kg. After a period of  $19 \pm 2$  h following the transfusion, mice were exposed to hypoxia (6.5% O<sub>2</sub>, 4 h) followed by 6 h of reoxygenation. The mice were then anesthetized and sacrificed. The lungs and the hearts were rapidly dissected, frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . mRNA encoding for ICAM1, VCAM1, BCAM (Lu), haem-oxygenase-1 (HMOX1), tissue factor (F3), EDN1 and interleukin 1 $\beta$  (IL1B) were quantified by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) using the Quantitect SYBR<sup>®</sup>green PCR kit (Qiagen, Courtabouef, France) and the Light Cycler<sup>®</sup> System (Roche Diagnostics, Meylan, France). The protein concentration of malondialdehyde (MDA) and advanced oxidation protein product (AOPP), markers of lipid and protein oxidations respectively, were determined using the bicinchoninic acid (BCA) protein assays Kit (Novagen, Darmstadt, Germany). Concentrations of MDA were determined as thiobarbituric-reactive substances and measured at 532 nm by spectrophotometry. AOPP were assayed in the lung homogenate using the method described by Witko-Sarsat *et al* (1996). All the reagents were purchased from Sigma (St Quentin-Fallavier, France).

#### Evaluation of safety profile in healthy mice

Free IHP injected intravenously at massive dosage to mice induces rapid plasmatic calcium depletion, leading to convulsions and death of animals (Gersonde & Weiner, 1981). In order to investigate the safety profile of treatment, male OF1 mice were injected with control RBCs ( $n = 12$ ), IHP-RBCs ( $n = 12$ ), and free IHP solutions: 2 mmol/l ( $n = 12$ ), 5 mmol/l ( $n = 6$ ), 10 mmol/l ( $n = 6$ ), 20 mmol/l ( $n = 6$ ) intravenously in the caudal vein at a dosage of 8 ml/kg body weight. Eight untreated mice were taken as the reference for physiological values. Quantichrom<sup>TM</sup> assay kits (Gentaur) were used to measure plasma levels of blood urea nitrogen (BUN), creatinine, calcium, and alanine transaminase (ALT). In order to check whether IHP-RBCs transfusions impair nitric oxide (NO) bioavailability or not, nitrite/nitrate (NOx) levels were assayed colourimetrically using a commercial kit (760871; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). All parameters were measured 1 h or 24 h post-transfusion.

#### Statistics

Values are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Kaplan–Maier survival curves were used for survival study. Differences between two experimental groups were analysed with Student *t*-test or with the Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney *U*-test. All the calculations were made with Statistica (Version 10.0; Statsoft, Tulsa, OK, USA). Differences between groups were considered to be significant when  $P \leq 0.05$ .



## Results

### Characteristics of murine IHP-RBCs

IHP-RBCs displayed decreased mean cell volume ( $40.7 \pm 0.1$  vs.  $46.7 \pm 0.1 \mu\text{m}^3$ ), mean cell haemoglobin concentration ( $308 \pm 02$  vs.  $316 \pm 02 \text{ g/l}$ ) and mean corpuscular haemoglobin ( $12.1 \pm 0.5 \text{ pg}$  vs.  $14.7 \pm 0.0 \text{ pg}$ ) as compared to native RBCs ( $P < 0.05$ , Table 1). Murine IHP-RBCs entrapment (approximately  $11.6 \mu\text{mol IHP/g Hb}$ ) was characterized by an increased  $P_{50}$  ( $47 \pm 2 \text{ mmHg}$ ) compared with native RBCs ( $35 \pm 1 \text{ mmHg}$ ,  $P < 0.02$ ) but, more importantly, compared with BERK mice SS-RBCs ( $35 \pm 3 \text{ mmHg}$ ,  $P < 0.02$ ) and SAD mice HbS-RBCs ( $38 \text{ mmHg}$ ) (Blouin *et al*, 2000). Extracellular Hb ( $<10 \text{ g/l}$ ) and extracellular IHP fraction ( $<20\%$ ) showed high stability of suspension after overnight storage. The murine control suspension, consisting of C57BL/6J whole blood further processed with washes and  $25^\circ\text{C}$  incubation, presented the same haematological modifications as human packed RBCs when compared to human whole blood: the leucocyte count was greatly reduced ( $1.9 \pm 0.2 \cdot 10^9 \text{ cells/l}$  vs.  $8.9 \pm 0.25 \cdot 10^9 \text{ cells/l}$  for C57BL/6J whole blood) and 2,3-DPG levels were significantly decreased ( $4.0 \pm 1.3$  vs.  $31.4 \pm 1.2 \mu\text{mol/g Hb}$  for C57BL/6J whole blood) (Table 1). *In vivo*, IHP-RBCs exhibited lower stability than control suspension RBCs, with a significantly decreased cell survival at 24 h post-transfusion ( $70 \pm 3\%$  vs.  $86 \pm 1\%$  respectively,  $P < 0.05$ ) and a reduced half-life (10.5 and 12.8 days respectively).

### Effect of chronic IHP-RBCs transfusions in BERK mice

Chronic RBC exchanges allowed progressive accumulation of injected RBCs in the circulation of BERK mice, reaching a

mean proportion of  $21 \pm 1\%$  and  $29 \pm 3\%$  for IHP-RBCs and control RBCs, respectively, at the time mice were sacrificed.

*Mice survival.* During the study, some mice died from severe complications of the disease. As expected, chronic transfusions with control RBCs improved the survival rate compared with untreated mice (75% vs. 40%, Fig. 2), confirming the well-known positive effects of transfusion therapy. However, when chronic transfusion was performed with IHP-RBCs, the benefit was even greater than for control RBCs (86%).

*Organ development.* Due to a lack of data collected for male mice, interpretation of results on organ pathology was based only on female mice. The relative weights (organ weight/body weight ratio) of the spleen, liver and heart were significantly higher in BERK mice while their brain relative weight was lower compared to C57BL/6J mice ( $P < 0.05$ , Table 2). The relative brain weight of mice who received IHP-RBCs (Fig. 3A) was higher than that of untreated mice and mice who received control RBCs ( $P < 0.05$ ) and did not significantly differ from that of wild mice ( $P > 0.05$ ). In the spleen, the constant removal of abnormal sickled cells from the circulation and filtration by the red pulp produced massive RBC sequestrations and a complete loss of the splenic lymphoid architecture (Fig. 3B). As a result, the red pulp-white pulp ratio was strongly increased in BERK mice (Fig. 3B). Both IHP-RBCs and control RBCs decreased spleen weight/body weight ratio, with a significant effect observed with control RBCs ( $3.6 \pm 0.2\%$  vs.  $6.0 \pm 0.8\%$  for untreated BERK mice). However, IHP-RBCs treatment produced a

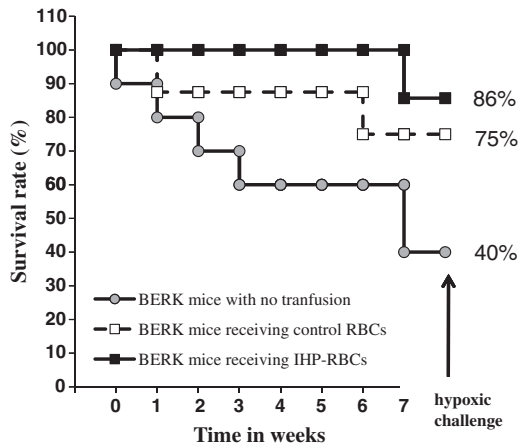
Table 1. Haematological characteristics of red blood cell suspensions.

	C57BL/6J whole blood	C57BL/6J control suspension	C57BL/6J IHP-loaded RBCs	BERK SS-RBCs	SAD HbS-RBCs
Number of batches	$n = 28$	$n = 22$	$n = 28$	$n = 3$	$n = 3-4$
MCH, pg	$14.7 \pm 0.0$	$15.1 \pm 0.1$	$12.1 \pm 0.5^*$	ND	ND
MCV, $\mu\text{m}^3$	$46.7 \pm 0.1$	$47.6 \pm 0.2$	$40.7 \pm 0.1^*$	ND	ND
MCHC, g/l	$316 \pm 2$	$318 \pm 2$	$308 \pm 2^*$	ND	ND
Leukocytes, $10^6/\text{ml}$	$8.9 \pm 0.5$	$1.9 \pm 0.2$	–	ND	ND
Extracellular Hb, g/l	NA	$3.5 \pm 0.2$	$6.4 \pm 0.4$	ND	ND
Entrapped IHP, $\mu\text{mol/g Hb}$	NA	NA	$11.6 \pm 0.3$	ND	ND
Extracellular IHP, %	NA	NA	$7.2 \pm 2.6$	ND	ND
2,3-DPG, $\mu\text{mol/g Hb}$	$31.4 \pm 1.2$	$4.0 \pm 1.3$	$17.5 \pm 1.9^*$	$29.5 (n = 1)$	$32.1^\ddagger$
$P_{50}$ , mmHg	$35 \pm 1$	$22 \pm 1$	$47 \pm 2^*$	$35 \pm 3$	$38^\ddagger$
Oxygen saturation at 100 mmHg, %	$93 \pm 0$	$97 \pm 0$	$76 \pm 1^*$	$95 \pm 1$	ND
24 h post-transfusion survival	NA	$86 \pm 1\%$	$70 \pm 3\%$	ND	ND
<i>In vivo</i> half-life	NA	12.8 days	10.5 days	ND	ND

\*Indicates  $P < 0.05$  (paired Student's *t*-test compared to C57BL/6J whole blood).

†Data from the literature (Blouin *et al*, 2000).

IHP, Inositol Hexaphosphate; MCH(C), mean cell haemoglobin (concentration); MCV, mean cell volume; 2,3-DPG, 2,3-diphosphoglycerate; NA, not applicable; ND, not done.



**Fig 2.** Survival of BERK SCD mice after chronic transfusions with control-RBCs or IHP-RBCs. Male and female mice (10 untreated mice, seven mice treated with IHP-RBCs and eight mice treated with control RBCs) were followed over a period of 7 weeks. During this period, some mice died from severe complications of the disease allowing plotting of Kaplan–Maier survival curves. After hypoxic stress, surviving mice were voluntarily sacrificed for blood and organ analysis. AA-RBCs, control red blood cells; IHP-RBCs, Inositol hexaphosphate-loaded red blood cells.

**Table 2.** Organ weights expressed as a percentage of total body weight in 13 to 15-week-old untreated female BERK mice and female C57BL/6J mice

Organ	Relative weight (% of total body weight)	
	BERK ( <i>n</i> = 3)	C57BL/6J ( <i>n</i> = 5)
Spleen	6.00 ± 0.77	0.45 ± 0.03†
Kidneys	0.89 ± 0.09	0.66 ± 0.02
Liver	7.63 ± 0.43	5.05 ± 0.11†
Brain	1.89 ± 0.08	2.17 ± 0.03*
Heart	0.75 ± 0.05	0.64 ± 0.08

\*Indicates  $P < 0.05$ .

†Indicates  $P < 0.01$ .

3-fold lower red pulp-white pulp ratio in comparison with untreated mice (Fig. 3B,  $P < 0.05$ ). Concerning the other organs, the differences between treated and untreated mice did not reach statistical significance.

**Anaemia and acute sequestration events.** From  $T_0$  to  $T_7$ , untreated mice became severely anaemic as evidenced by the Hb level, dropping from  $90 \pm 6$  g/l to  $55 \pm 6$  g/l ( $P < 0.05$ ) associated with a huge fall in haematocrit (from  $32 \pm 2\%$  to  $22 \pm 2\%$ ). In addition, acute hypoxic stress to which mice were subjected at  $T_7$  promoted sequestrations of sickled RBCs in organs, as illustrated in the liver (Fig. 4A), and thus worsened anaemia. Due to the low surviving rate of animals in the group of untreated mice, statistical analyses were only performed between treated mice. At  $T_7$ , mice transfused with control RBCs maintained satisfactory Hct and Hb level under

normoxic conditions ( $26 \pm 2\%$  and  $71 \pm 4$  g/l respectively) but were highly affected by acute hypoxia, with the Hct and Hb level significantly falling to  $21 \pm 1\%$  and  $59 \pm 4$  g/l (Fig. 4B,  $P < 0.05$ ). In contrast, in mice receiving IHP-RBCs, Hct and Hb level did not significantly decrease after hypoxia ( $26 \pm 2\%$  and  $70 \pm 6$  g/l, Fig. 4B–C) with Hct value remaining significantly elevated as compared to mice treated with control RBCs ( $P < 0.05$ ). The circulating platelet count in untreated BERK mice tended to peak between  $T_0$  and  $T_6$  before decreasing at  $T_7$ , and further decreased after hypoxic stress (Fig. 4D). Mice that received IHP-RBCs tended to display higher circulating platelets at  $T_7$  than mice that received control RBCs under normoxic conditions ( $1400 \pm 233$  vs.  $991 \pm 229$   $10^3/\text{mm}^3$  respectively,  $P = 0.08$ , Fig. 4E). The same tendency was observed after hypoxia.

**Investigation of VOC risk factors.** Adhesion to the endothelium occurs at the onset of VOC. To evaluate the risk of adhesion to the blood vessel wall, we measured the proportion of circulating reticulocytes (most adhesive RBCs (Kaul *et al*, 2009)) and the plasma levels of THBS1, the main protein responsible for bridging between reticulocytes and endothelial cells (Fig. 5A,B). Whereas the treatment with control RBCs tended to slightly decrease circulating reticulocytes ( $P > 0.05$ ), transfusions of IHP-RBCs significantly reduced this proportion ( $26 \pm 3\%$  vs.  $42 \pm 2\%$  for untreated mice,  $P < 0.01$ ). THBS1 plasma level tended to be lower in IHP-RBCs mice compared to untreated mice ( $P = 0.052$ ) and was significantly reduced compared to mice treated with control RBCs ( $P < 0.05$ ). In addition, histological analysis of the lungs revealed a tendency of IHP-RBCs transfusions to reduce the immunostaining of VCAM1 as compared to control RBCs transfusions (Fig. 5C,D). The plasma level of vasoconstrictor EDN1 tended to decrease with IHP-RBCs and to increase with control RBCs transfusions ( $P < 0.05$  between IHP-RBCs and control RBCs, Fig. 5E). The levels of acute phase response proteins SAP and sPLA2 were measured at the steady state to investigate the effect of treatment on inflammation. Chronic transfusions exhibited no effect on SAP levels ( $P > 0.1$  for both control RBCs and IHP-RBCs, data not shown). However, unlike control RBCs, IHP-RBCs treatment tended to reduce sPLA2 levels ( $5563 \pm 1057$  pg/ml vs.  $8207 \pm 1652$  pg/ml for untreated mice, Fig. 5F,  $P = 0.2$ ).

#### Effect of a single IHP-RBCs transfusion in SAD mice

**Adhesion molecules.** A single IHP-RBCs administration to mice 19 ± 2 h before acute hypoxia (4 h) produced a 7-fold reduction in lung *Vcam1* mRNA levels after hypoxia/reoxygenation (H/R) compared to mice who received control RBCs ( $P < 0.05$ , Fig. 6). The measurement of *Icam1* and *Bcam* mRNA levels in the lung showed no improvement with IHP-RBCs but highlighted a significant up-regulation of those adhesion molecules mRNA with control RBCs in response to H/R (Fig. 6).



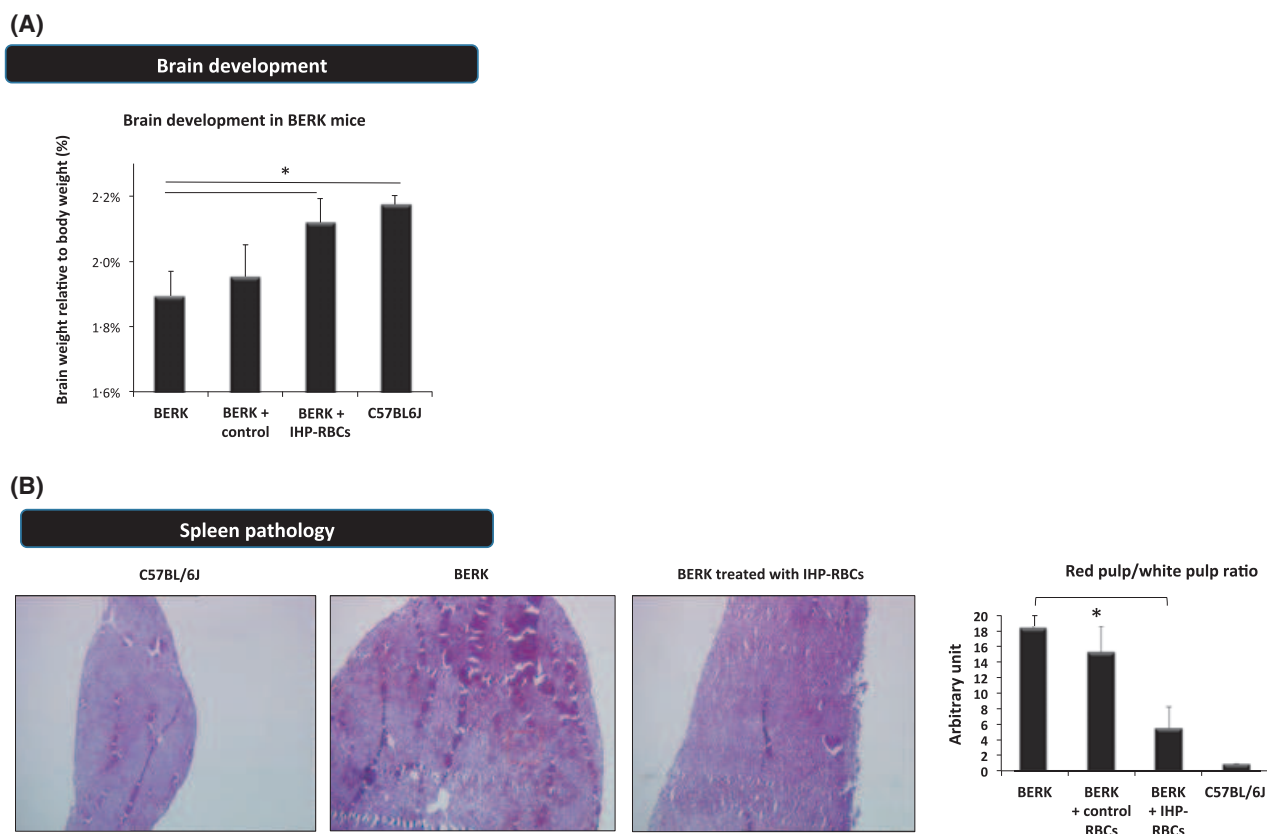


Fig 3. Relative brain weight and spleen histology in BERK SCD mice after chronic transfusions with control-RBCs or IHP-RBCs. (A) Brain development in female BERK mice expressed as brain weight compared to total body weight.  $n = 2$  mice for control RBCs. (B) Typical histological sections (original magnification  $\times 40$ , haematoxylin & eosin staining) of the spleen of C57BL/6J, untreated BERK mice, and BERK mice treated with IHP-RBCs showing significant splenic enlargement and increase in the red pulp/white pulp ratio in transgenic BERK mice; far right: red pulp/white pulp ratio in untreated and treated BERK mice.  $*P < 0.05$ .

*Vascular tone, intravascular haemolysis and tissue factor (F3).* IHP-RBCs treatment had a tendency to lower lung mRNA expression of *F3*, *Hmox1* and *Edn1* compared to untreated SAD mice but, more importantly, significantly reduced these gene expressions compared to normal RBCs ( $P < 0.05$ , Fig. 6).

*Inflammation.* Both control RBCs and IHP-RBCs produced inflammation in the lungs of mice with increased *Il1b* mRNA levels (Fig. 6).

*Oxidative stress.* Both IHP-RBCs and control RBCs significantly reduced lung MDA and AOPP concentrations compared to untreated SAD mice ( $P < 0.05$ ).

#### Safety profile of IHP-RBCs transfusion in healthy mice

Serum calcium was measured to detect any chelating effect due to IHP. In untreated mice, calcium levels ranged between 1.92 to 2.97 mmol/l. The transfusion of IHP-RBCs loaded with approximately 2.8 mmol/l IHP did not lower calcium concentrations at 1 and 24 h post-transfusion ( $2.52 \pm 0.15$  and  $2.50 \pm 0.15$  mmol/l respectively), neither

did the injection of 2 and 5 mmol/l IHP (Fig. 7). Indeed, toxicity relative to IHP was observed with much higher amounts. Mice injected with free IHP at concentrations of 10 and 20 mmol/l died from convulsions within 2 min following the transfusion, allowing estimation of intravenous  $LD_{50}$  (dose that killed 50% of the mice) of IHP between 5 and 10 mmol/l. Unconjugated bilirubin significantly increased 1 h after IHP-RBCs and control RBCs transfusion compared to untreated mice. ALT, measured to evaluate hepatocellular injury, also tended to increase 1 h after the transfusion of IHP-RBCs. However, normalization of values was observed 24 h after transfusion. BUN and creatinine measured to evaluate renal function showed similar levels in all experimental groups ( $P > 0.05$ ). In untreated mice,  $NO_x$  ranged between 102  $\mu\text{mol/l}$  and 560  $\mu\text{mol/l}$ . Those levels remained unchanged after transfusion of IHP-RBCs or control RBCs ( $P > 0.05$ ).

## Discussion

Entrapment of IHP in transfused RBCs to increase blood-stream oxygenation was hypothesized to reduce SCD pathology. Among the natural and synthetic effectors of Hb, IHP

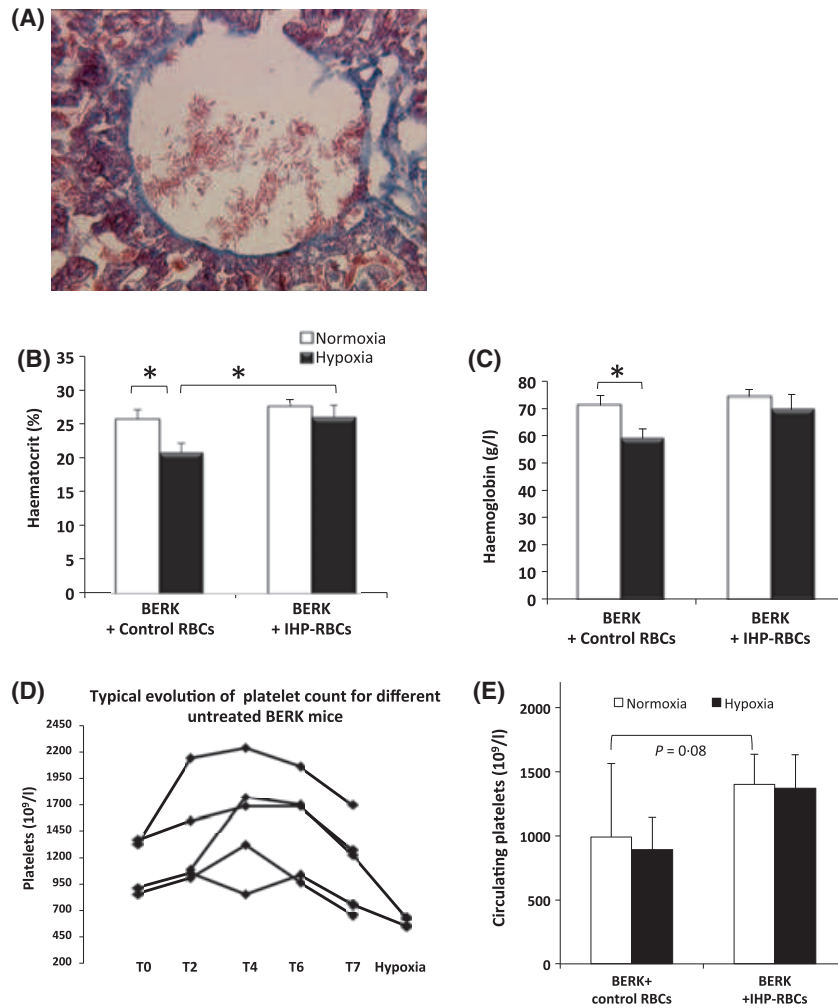


Fig 4. Effect of IHP-RBCs on haematological parameters. (A) Histological section of the liver of untreated BERK mice after hypoxic stress showing vascular congestion with sickled RBCs (Original magnification  $\times 100$ , Masson trichrome staining) (B) Haematocrit and (C) haemoglobin in treated mice. (D) Course of platelet count over the studied period in different untreated BERK mice showing a peak of circulating platelets followed by a fall enhanced by hypoxia. (E) Platelet count was compared in mice treated either with control RBCs or IHP-RBCs before and after the hypoxic stress. \* $P < 0.05$ .

was the most suitable molecule for therapeutic application in SCD. Indeed, its polyanion chemical structure produces stable trapping in transfused RBCs. This is not the case for other effectors, such as myo-inositol trispyrophosphate (ITPP), a synthetic compound derived from myo-inositol hexakisphosphate (IP6) or bezafibrate analogs with lipophilic structures which have the drawback of permeating RBCs. After transfusion of RBCs loaded with ITPP or bezafibrate to patients, a significant fraction of those effectors may leak from transfused RBCs, penetrate SS-RBCs and promote sickling. The best candidate, IHP, was thus entrapped in murine RBCs using a similar method to that for human RBCs (Bourgeaux *et al.*, 2010). The entrapment process did not alter the ability of RBCs to carry oxygen as evidenced by elevated mean cell haemoglobin concentration values ( $>300$  g/l). Resulting IHP-RBCs exhibited a significant rightward shift of  $P_{50}$  compared with RBCs of SCD transgenic mice ( $\Delta P_{50}$  of

12 and 9 mmHg in BERK and SAD mice models, respectively), suggesting a similar mechanism of action of IHP-RBCs in mice as that in human patients. Besides, despite the well-known fragility of murine RBCs compared to human RBCs, IHP-RBCs displayed satisfactory *in vivo* stability. All these findings validated the use of murine transgenic models for the proof of concept of IHP-RBCs in SCD.

The first study conducted in BERK mice investigated the effect of IHP-RBCs as chronic treatment. Chronic transfusion programmes in humans aim to reduce HbS below 30%, which requires approximately 5–6 units of packed RBCs every month. But, with emerging problems of blood availability, the difficulty in finding cross-matched blood to avoid allo-immunization (Wahl & Quirolo, 2009) and the increasing number of SCD patients, clinicians are likely to encounter increasing difficulties in conducting those programmes under the same conditions and may have to reduce the

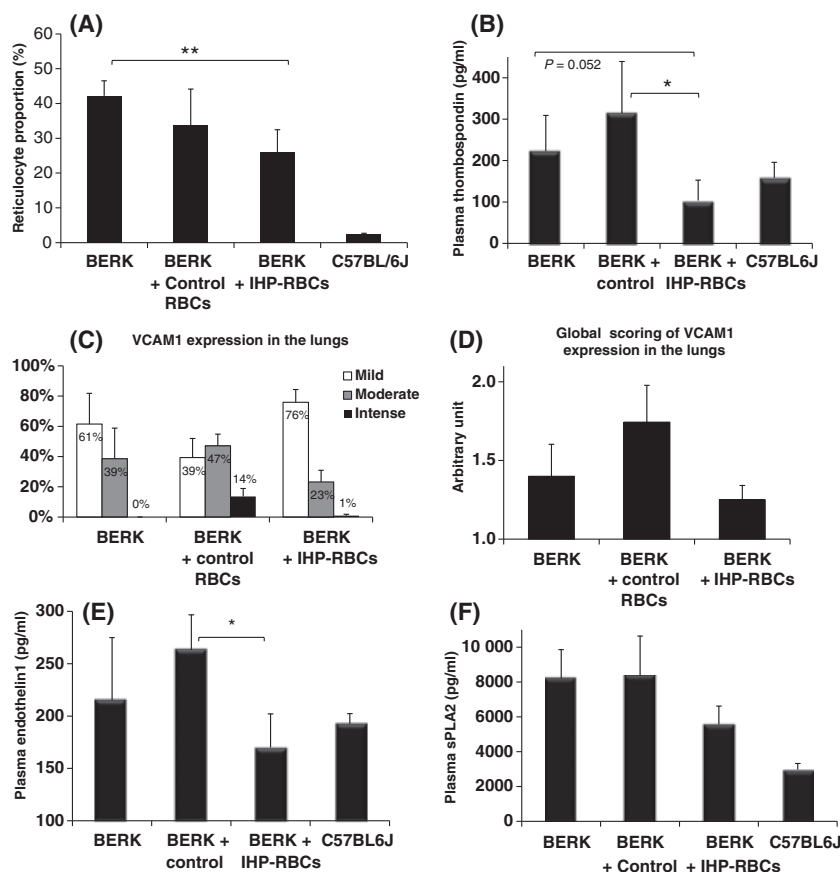


Fig 5. Factors associated with the risk of vaso-occlusion in BERK mice after chronic transfusions with control-RBCs or IHP-RBCs. (A,B) The risk of adhesion to the blood vessel wall was evaluated with measurement of circulating reticulocytes (most adhesive RBCs) and plasma thrombospondin bridging protein. (C,D) Vascular cell adhesion molecule (VCAM1) immunostaining in the lungs of BERK mice. (E,F) Endothelin-1 (EDN1) and sPLA2 plasma concentrations. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

volume of transfusions. Therefore, to check whether IHP-RBCs with increased oxygenation properties may potentiate transfusion therapy at lower dosage, HbS levels in BERK mice were diluted to only approximately 70%. The benefit of IHP-RBCs over conventional transfusion under those conditions was observed in different aspects of pathophysiology: (i) the chronic replacement of SS-RBCs with IHP-RBCs improved the survival rate of mice (ii) IHP-RBCs improved the splenic lymphoid architecture and corrected impaired brain development (iii) IHP-RBCs prevented anaemia under both normoxic and hypoxic conditions and reduced symptoms of sequestration events (iv) IHP-RBCs lowered the risk of VOC. Throughout the study, BERK mice died from severe anaemia and multiple sequestration crises. Usually, these mice present wide inter-individual variability of SCD symptoms and experience approximately 20% mortality between weaning and the age of 14 weeks. However, in the present study, the specific criterion for mice inclusion based on elevated reticulocytosis led to the selection of only animals that displayed splenomegaly and severe SCD symptoms. As a result, mortality was increased. Although IHP-RBCs were in a lower proportion in the circulation of mice than control

RBCs, a continuous oxygen supply enabled a decrease in the mortality rate of the mice. As initially observed by Pászty *et al* (1997), BERK mice are severely anaemic when adults. Our results (at  $T_7$ ) confirm these observations. One interesting point in the present study is that anaemia worsened in untreated mice from  $T_0$  to  $T_7$  (without any hypoxia exposure). This was less obvious in mice treated with IHP-RBCs. Our results thus suggest that IHP-RBCs treatment could limit the development of anaemia in BERK mice. Chronic RBC exchanges with normal RBCs also corrected anaemia under normoxic conditions, but were ineffective in preventing the dramatic Hb loss produced by acute hypoxia. Similar sudden Hb loss (10–20 g/l) is usually observed in SCD children suffering from acute splenic or hepatic sequestrations (Araujo, 2009) characterized by a pooling of sickled RBCs and platelets in the affected organ. In BERK mice, hypoxic stress may have artificially induced those sequestration events, as evidenced by a dramatic decrease in Hb level and circulating platelets. This Hb and platelet loss was strongly inhibited in mice that received IHP-RBCs under the hypothesis of an increased lifespan of SS-RBCs due to IHP-RBCs induced oxygenation and reduced sickling. The therapeutic

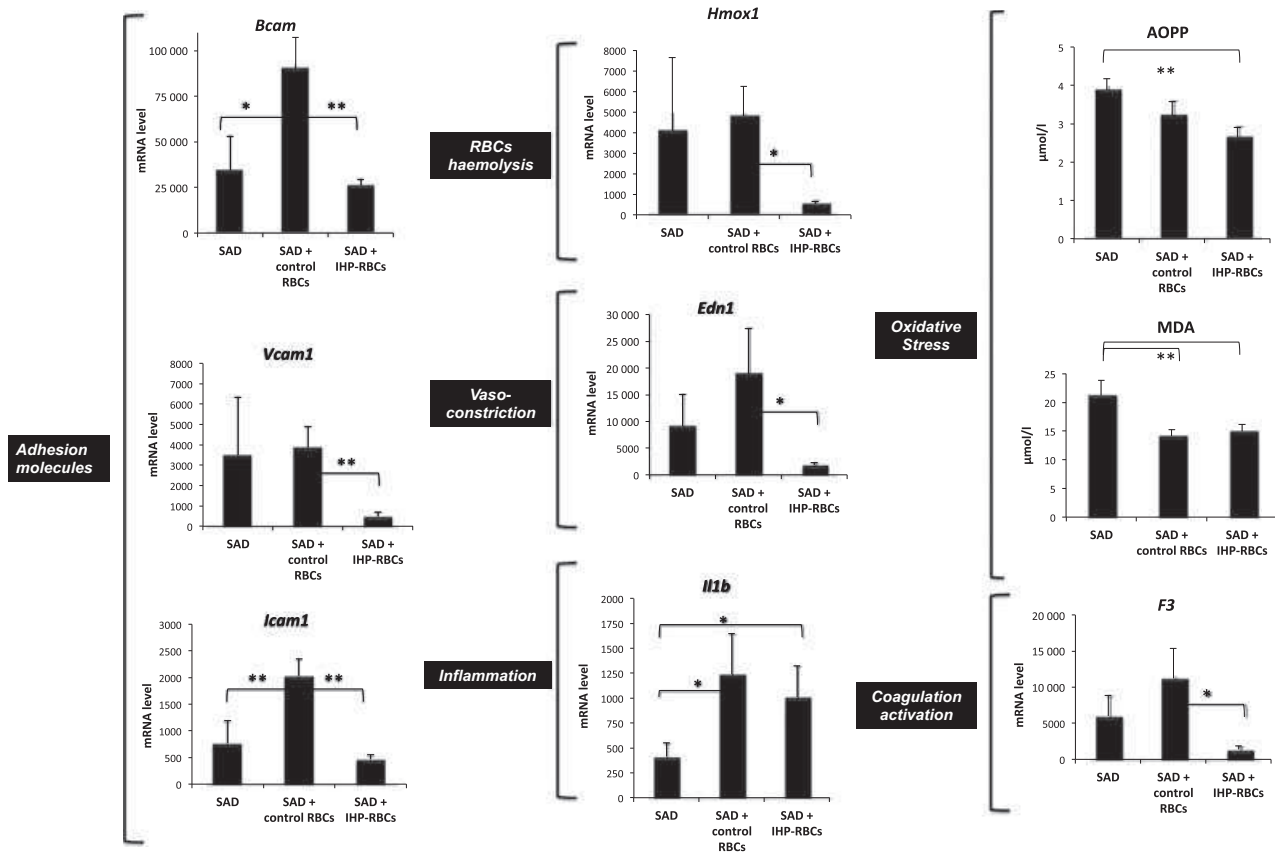


Fig 6. Effect of single transfusion with control-RBCs or IHP-RBCs in SAD mouse lungs. SAD mice were transfused with IHP-RBCs or control RBCs.  $19 \pm 2$  h following the transfusion, mice were subjected to 4 h of hypoxia (6.5%O<sub>2</sub>) followed by 6 h of reoxygenation to induce ischaemic-reperfusion injury. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

benefit of IHP-RBCs on the lifespan of SS-RBCs was also evidenced by a lower red pulp-white pulp ratio in the structure of the spleen, which suggests reduced RBC sequestration (Trudel *et al*, 1994; Mancini *et al*, 2006; Pestina *et al*, 2009). Regarding organ pathology, SCD children may experience delayed brain volumetric growth (Steen *et al*, 2005), partially explained by abnormal oxygen delivery to the brain and recurrent silent brain infarcts (Hogan *et al*, 2006). We found that 3-5-month-old BERK mice shared the same defect in brain development. The brain is one of the organs most affected by hypoxaemia. IHP-RBCs chronic treatment appeared to effectively correct impaired brain development in BERK mice (80% improvement of brain weight defect versus only 20% in mice treated with control RBCs, Fig. 3A). Taken together, our results suggest that IHP-RBCs treatment in BERK mice was associated with a reduction of organ pathology, possibly resulting in the increased survival rate observed.

IHP-RBCs, by modulating blood cell components and probably improving the vascular tone, may also have reduced the risk of VOC, the most devastating complication of SCD. Adhesion processes are widely involved in the onset of blood vessel obstruction and THBS1 is one of the major promoters

of sickle reticulocyte adhesivity (Sugihara *et al*, 1992; Gupta *et al*, 1999). Therefore, the concomitant reduction of reticulocytosis and THBS1 bridging protein in the circulation of mice that received IHP-RBCs may lower the risk of adhesion to the endothelium. Vasoconstriction, which greatly contributes to VOC, was investigated with the measurement of plasma EDN1, a peptide produced by endothelial cells in response to hypoxia (Ergul *et al*, 2004). As expected, IHP-RBCs transfusions reduced the expression of the vascular tone modulator in BERK mice but surprisingly, a deleterious effect of conventional transfusion therapy with increased EDN1 values was observed. A similar overproduction of EDN1 following blood transfusion has already been reported in healthy premature infants, suggesting that conventional transfusions may lead to tissue injury through endothelin-induced oxygen radical formation (Sasai-Takedatsu *et al*, 1994). EDN1 was also reported to slightly increase in thalassemia patients during the first 24 h post-transfusion, although it substantially declined 7 days later (Viprakasit *et al*, 2002). In our study, increased EDN1 levels in mice receiving normal RBCs were observed after the hypoxic stress. One hypothesis for this deleterious effect is that hypoxia-induced RBC haemolysis in mice that received

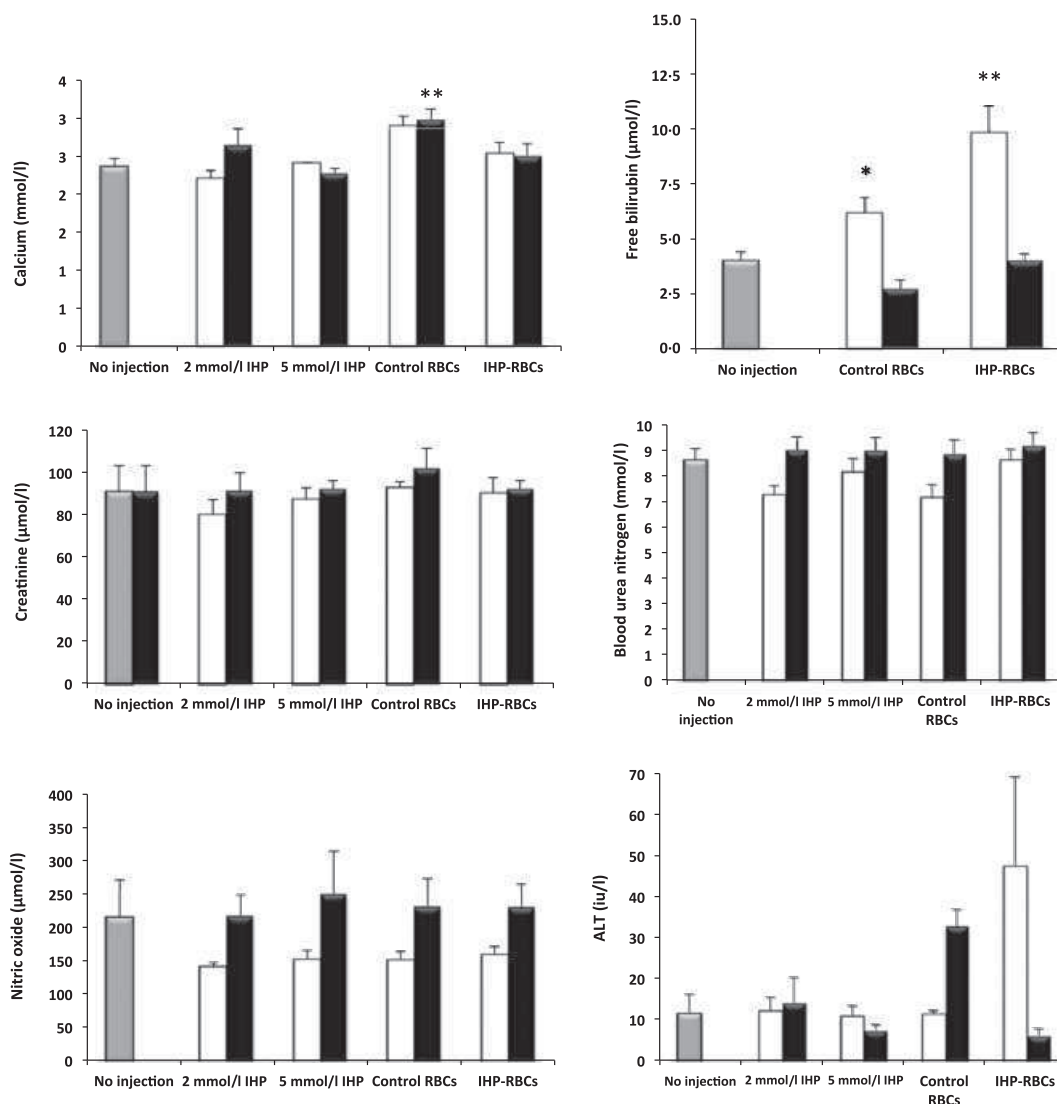


Fig 7. Safety profile of IHP-RBCs for acute prophylactic transfusions. OF1 healthy mice were injected with 8 ml/kg of IHP-RBCs, control RBCs, or free solutions of IHP (2, 5, 10 and 20 mmol/l). Calcium, creatinine, blood urea nitrogen, NOx and alanine transaminase (ALT) were determined in plasma of mice 1 h (white bars) and 24 h (black bars) post-transfusion. Eight untreated mice were used as references for physiological values (grey bars). The results are the combination of two separate experiments giving similar results. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

normal RBCs decreased NO bioavailability. As NO modulates the expression of endothelin receptors, a decrease of NO during a SCD crisis could have upregulated EDN1 expression (Reiter & Gladwin, 2003; Bartolucci *et al*, 2007; Gladwin & Kato, 2007; Wood *et al*, 2008). The benefit of IHP-RBCs over normal RBCs in BERK mice was also observed on inflammatory processes. Indeed, the acute phase response protein PLA2 is widely activated upon hypoxia, inducing the secretion of low molecular weight in the extracellular medium (Portilla *et al*, 1992; Choi *et al*, 1995). IHP-RBCs, by continuously inhibiting mild hypoxia at the steady state, tended to prevent the secretion of sPLA2. In addition, sPLA2 has been described as an accurate and specific predictor of ACS (Styles *et al*, 2000; Naprawa *et al*, 2005), suggesting the benefit of IHP-RBCs in preventing lung injury. This hypoth-

esis was supported by the observation of a significantly reduced VCAM1 expression in the lungs of mice treated with IHP-RBCs. All those results show that low proportions of IHP-RBCs (approximately 21% in the circulation) effectively reduced the pathophysiology of BERK mice. This therapy could offer a powerful alternative for overcoming problems associated with future management of long-term preventive transfusions in human SCD.

The second study aimed to evaluate the effectiveness of a single IHP-RBCs transfusion to prevent acute lung injury in SAD mice. Indeed, many SCD patients suffer from lung injury with ACS and the management of this complication is not optimal. Patients who experience VOC crisis that can progress to ACS are first treated with analgesics for pain control and closely monitored with regular chest radiographs



over a period of 24–48 h to detect any complication with thrombosis. Transfusions are performed only after this period in cases of persistent pain and thrombus formation as seen on chest radiographs. The aim of transfusions is to rapidly reverse hypoxia and to prevent progression to ACS. Published data have shown the effectiveness of transfusions in reversing hypoxia, with PaO<sub>2</sub> values increasing from 63 to 71 mmHg (Walters *et al*, 2002). However, IHP-RBCs transfusions could further improve the partial pressure of oxygen, since at 63 mmHg, IHP-RBCs can release 30% of their oxygen versus only 10% for control RBCs (Bourgeaux *et al*, 2010). In SAD mice, several factors, including vascular adhesion molecules (ICAM1, VCAM1) (Belcher *et al*, 2005), were found to be overexpressed in the lungs after subjecting the animals to an acute hypoxic/reoxygenation stress (de Franceschi *et al*, 2003). Therefore, our study was designed with SAD mice that were artificially stressed in an oxygen-reduced atmosphere and that were voluntarily sacrificed 19 ± 2 h after transfusion to evaluate the effectiveness of treatment in preventing lung injury within a short period of time. As expected, IHP-RBCs tended to prevent acute lung injury with lowered mRNA levels of molecules involved in adhesion and vaso-constriction processes as well as coagulation activation. The major effect of IHP-RBCs compared to untreated mice was observed on oxidative stress prevention with significantly reduced levels of the oxidative biomarkers MDA and AOPP. However, the most significant and relevant results of this study were observed between IHP-RBCs and control RBCs treated mice. Indeed, the present experiment highlighted some major deleterious effects when transfusing control RBCs to mice with increased lung levels of mRNA encoding for adhesion molecules ICAM1 and BCAM and EDN1 vaso-constrictor. Several hypotheses may explain these side effects of conventional blood transfusions in SAD mice: (i) The incomplete replenishment of 2,3 DPG in transfused control RBCs at the time the mice were killed may have delayed the therapeutic benefit of blood transfusion. Indeed, to fully mimic blood units used in human transfusion, control murine RBCs were 2,3-DPG depleted, which decreased their P<sub>50</sub> value far below the P<sub>50</sub> of SS-RBCs in SAD mice (22 mmHg vs. 38 mmHg, respectively, Table 1). Given that it takes a minimum time of 24–48 h to regenerate the 2,3-DPG metabolite *in vivo*, control RBCs may pump oxygen from SS-RBCs within the first 24 h following the transfusion, worsening the pathophysiology rather than acting as effective oxygen supplier. In contrast, IHP-RBCs, which are specifically designed to induce rapid oxygenation of the bloodstream and tissues (P<sub>50</sub> of 47 mmHg) could be more effective in preventing lung injury immediately after the transfusion. (ii) Slight hyperviscosity of blood induced by the transfusion may have led to complications in mice transfused with normal RBCs. Indeed, it is strongly recommended that the Hct should be maintained below 35–40% when transfusing patients, since oxygen distribution decreases at higher Hct. SAD mice are not anaemic and display Hct values around 40%. Therefore,

the transfusion of 28 ml/kg with only hypovolaemic compensatory blood collection (16 ml/kg) may have further increased the Hct in mice who received control RBCs and IHP-RBCs. For mice treated with control RBCs, this probably increased viscosity may have worsened lung injury compared to untransfused SAD mice. On the contrary, IHP-RBCs transfusion, by limiting the hypoxic environment in pulmonary blood vessels, prevented the increase of molecules responsible for pathological events and may have counterbalanced the deleterious effects due to potential hyperviscosity (iii) haemolysis of most fragile RBCs following the transfusion may participate in endothelium activation. Even though haemolysis is increased in case of IHP-RBCs, again, the deleterious effect may be counterbalanced by the benefits of improved oxygenation. All these findings suggest that replacing control RBCs by IHP-RBCs in particular may be appropriate for the treatment of acute sickle events, such as ACS, requiring rapid and efficient oxygenation to reverse hypoxia. For a clinical application, the development of relevant biological parameters, such as sPLA<sub>2</sub>, as a clinical predictor of ACS (Styles *et al*, 2000; Naprawa *et al*, 2005) allows a delay of 24–48 h before transfusing patients, which is fully compatible with IHP-RBCs blood unit manufacture and delivery to hospital.

Another feature of SCD pathology is the reduced availability of the vaso-dilator, NO, due to RBC haemolysis. An investigation of the impact of IHP-RBCs transfusion on NO bioavailability has not revealed any detectable effect.

In terms of safety, a single intravenous administration of IHP-RBCs did not produce any apparent toxicity in healthy mice. Only moderate haemolysis was observed after transfusion with increased serum bilirubin and transaminase levels but those parameters returned to normal within 24 h. The fact that unbound bilirubin was found at higher levels 1 h post-transfusion in the IHP-RBCs treated group is explained by the reduced 24 h-post transfusion survival of IHP-RBCs compared with control RBCs (Table 1). Regarding IHP toxicity, the extracellular IHP present in murine IHP-RBCs suspension was at least 10 times less than the LD<sub>50</sub> of IHP. In extremely rare cases of a delayed haemolytic reaction following the transfusion, IHP concentrations released in the plasma of mice would be approximately 2.8 mmol/l, which is insufficient to induce calcium chelation and is two times less than the LD<sub>50</sub> of IHP. In addition, it has been reported that the toxic manifestations of intravenous IHP could be significantly reduced by lowering the infusion rate (Gersonde & Weiner, 1981). Therefore, considering a therapeutic application in humans, potential toxicity associated with IHP could be avoided by reducing the transfusion rate of IHP-RBCs to SCD patients and by oral supplementation with calcium to chelate free IHP. But, long-term toxicity as well as toxicity of repeated transfusions remain to be investigated.

In summary, the present study provides evidence in two different sickle cell mice models that entrapment of IHP in transfused RBCs could be a powerful tool to prevent acute

or chronic manifestations of SCD. IHP-RBCs, by increasing the oxygen supply, seem to act not only on sickling but also on the different vascular events involved in the sickle cell crisis. In chronic therapy, the use of IHP-RBCs could reduce the number of RBC units to be transfused but also the frequency of transfusions, thus improving patient quality of life. In addition, with the recent improvements in scoring acute of SCD, IHP-RBCs may potentiate simple transfusion in the treatment of chest syndromes by acting more rapidly and more efficiently. Upscaling human packed IHP-RBCs to current good manufacturing practice (cGMP) is currently under validation, making it possible to conduct the proof of concept in sickle cell patients in the near future.

## Acknowledgements

We wish to thank Gaelle Delcambre, Johan Faucoulanche, Lorette Chartier, Emeline Lemarié for technical assistance, and Annie Varennes for bilirubin evaluation. This work was

made possible by financial support from the French ANR (Agence Nationale pour la Recherche) through a BiotechS project (ref ANR-08-BIOT-011-01).

## Conflict of interest disclosures

Y. Godfrin is the Executive Vice President of ERYTECH Pharma, V. Bourgeaux, Y. Campion, F. Horand and A. Marie Chevrier are employees of ERYTECH Pharma. The remaining authors declare no competing financial interests.

## Contribution

V. Bourgeaux, C. Martin, Y. Godfrin, F. Horand, E. Canet-Soulas designed the experiments. Y. Campion, A. Bessaad, E. Aufradet, G. De Souza, A. Marie Chevrier conducted the experiments. VB wrote the manuscript. YG, CM, ECS and EA revised the manuscript.

## References

- Adams, R.J., McKie, V.C., Brambilla, D., Carl, E., Gallagher, D., Nichols, F.T., Roach, S., Abboud, M., Berman, B., Driscoll, C., Files, B., Hsu, L., Hurlet, A., Miller, S., Olivieri, N., Pegelow, C., Scher, C., Vichinsky, E., Wang, W., Woods, G., Kutlar, A., Wright, E., Hagner, S., Tighe, F., Lewin, J., Cure, J., Zimmerman, R.A. & Waclawiw, M.A. (1998) Stroke prevention trial in sickle cell anemia. *Controlled Clinical Trials*, **19**, 110–129.
- Araujo, A.N. (2009) Acute splenic sequestration in children with sickle cell anemia. *Jornal de Pediatria*, **85**, 373.
- Bartolucci, P., Ngo, M.T., Beuzard, Y., Galacteros, F., Saber, G., Rideau, D., Eddahibi, S., Maitre, B., Adnot, S. & Delclaux, C. (2007) Decrease in lung nitric oxide production after peritonitis in mice with sickle cell disease. *Critical Care Medicine*, **35**, 502–509.
- 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–H2725.
- Blouin, M.J., Beauchemin, H., Wright, A., De, P. M., Sorette, M., Bleau, A.M., Nakamoto, B., Ou, C.N., Stamatoyannopoulos, G. & Trudel, M. (2000) Genetic correction of sickle cell disease: insights using transgenic mouse models. *Nature Medicine*, **6**, 177–182.
- Bourgeaux, V., Hequet, O., Campion, Y., Delcambre, G., Chevrier, A.M., Rigal, D. & Godfrin, Y. (2010) Inositol hexaphosphate-loaded red blood cells prevent in vitro sickling. *Transfusion*, **50**, 2176–2184.
- Choi, K.H., Edelstein, C.L., Gengaro, P., Schrier, R.W. & Nemenoff, R.A. (1995) Hypoxia induces changes in phospholipase A2 in rat proximal tubules: evidence for multiple forms. *The American Journal of Physiology*, **269**, F846–F853.
- Conran, N. & Costa, F.F. (2009) Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clinical Biochemistry*, **42**, 1824–1838.
- De Paepe, M.E. & Trudel, M. (1994) The transgenic SAD mouse: a model of human sickle cell glomerulopathy. *Kidney International*, **46**, 1337–1345.
- Ergul, S., Brunson, C.Y., Hutchinson, J., Tawfik, A., Kutlar, A., Webb, R.C. & Ergul, A. (2004) Vasoactive factors in sickle cell disease: in vitro evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction. *American Journal of Hematology*, **76**, 245–251.
- de Franceschi, L., Baron, A., Scarpa, A., Adrie, C., Janin, A., Barbi, S., Kister, J., Rouyer-Fessard, P., Corrocher, R., Leboulch, P. & Beuzard, Y. (2003) Inhaled nitric oxide protects transgenic SAD mice from sickle cell disease-specific lung injury induced by hypoxia/reoxygenation. *Blood*, **102**, 1087–1096.
- Gersonde, K. & Weiner, M. (1981) The influence of infusion rate on the acute intravenous toxicity of phytic acid, a calcium-binding agent. *Toxicology*, **22**, 279–286.
- Gladwin, M. & Kato, G. (2007) Hemolysis-Associated Endothelial Dysfunction and Pulmonary Hypertension. *Advances in Pulmonary Hypertension*, **6**, 23–30.
- Gupta, K., Gupta, P., Solovey, A. & Hebbel, R.P. (1999) Mechanism of interaction of thrombospondin with human endothelium and inhibition of sickle erythrocyte adhesion to human endothelial cells by heparin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1453**, 63–73.
- Hirani, A., Weibel, S. & Kane, G.C. (2011) Acute Chest Syndrome and Other Pulmonary Manifestations of Sickle Cell Disease. *Journal of Clinical Outcomes Management*, **18**, 211–221.
- Hogan, A.M., Pit-ten Cate, I.M., Vargha-Khadem, F., Prengler, M. & Kirkham, F.J. (2006) Physiological correlates of intellectual function in children with sickle cell disease: hypoxaemia, hyperaemia and brain infarction. *Developmental Science*, **9**, 379–387.
- Josephson, C.D., Su, L.L., Hillyer, K.L. & Hillyer, C.D. (2007) Transfusion in the patient with sickle cell disease: a critical review of the literature and transfusion guidelines. *Transfusion Medicine Reviews*, **21**, 118–133.
- Kaul, D.K., Finnegan, E. & Barabino, G.A. (2009) Sickle red cell-endothelium interactions. *Microcirculation*, **16**, 97–111.
- Kirkham, F.J. & Hogan, A.M. (2004) Risk factors for arterial ischemic stroke in childhood. *CNS Spectrums*, **9**, 451–464.
- Manci, E.A., Hillery, C.A., Bodian, C.A., Zhang, Z. G., Luty, G.A. & Coller, B.S. (2006) Pathology of Berkeley sickle cell mice: similarities and differences with human sickle cell disease. *Blood*, **107**, 1651–1658.
- Miller, S.T., Wright, E., Abboud, M., Berman, B., Files, B., Scher, C.D., Styles, L. & Adams, R.J. (2001) Impact of chronic transfusion on incidence of pain and acute chest syndrome during the Stroke Prevention Trial (STOP) in sickle-cell anemia. *Journal of Pediatrics*, **139**, 785–789.
- Nagel, R.L. & Fabry, M.E. (2001) The panoply of animal models for sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, **112**, 19–25.
- Naprawa, J.T., Bonsu, B.K., Goodman, D.G. & Ranalli, M.A. (2005) Serum biomarkers for identifying acute chest syndrome among patients who have sickle cell disease and present to the emergency department. *Pediatrics*, **116**, e420–e425.
- Pászty, C., Brion, C.M., Manci, E., Witkowska, H. E., Stevens, M.E., Mohandas, N. & Rubin, E.M. (1997) Transgenic knockout mice with exclu-



- sively human sickle hemoglobin and sickle cell disease. *Science*, **278**, 876–878.
- Pegelow, C.H., Adams, R.J., McKie, V., Abboud, M., Berman, B., Miller, S.T., Olivieri, N., Vichinsky, E., Wang, W. & Brambilla, D. (1995) Risk of recurrent stroke in patients with sickle cell disease treated with erythrocyte transfusions. *Journal of Pediatrics*, **126**, 896–899.
- Pestina, T.I., Hargrove, P.W., Jay, D., Gray, J.T., Boyd, K.M. & Persons, D.A. (2009) Correction of murine sickle cell disease using gamma-globin lentiviral vectors to mediate high-level expression of fetal hemoglobin. *Molecular Therapy*, **17**, 245–252.
- Portilla, D., Mandel, L.J., Bar-Sagi, D. & Millington, D.S. (1992) Anoxia induces phospholipase A2 activation in rabbit renal proximal tubules. *The American Journal of Physiology*, **262**, F354–F360.
- Rees, D.C., Williams, T.N. & Gladwin, M.T. (2010) Sickle-cell disease. *Lancet*, **376**, 2018–2031.
- 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*, **10**, 99–107.
- Sasai-Takedatsu, M., Kojima, T., Hirata, Y. & Kobayashi, Y. (1994) Production of endothelin-1 induced by blood transfusion in premature infants. *Vox Sanguinis*, **67**, 368–371.
- Steen, R.G., Emudianughe, T., Hunte, M., Glass, J., Wu, S., Xiong, X. & Reddick, W.E. (2005) Brain volume in pediatric patients with sickle cell disease: evidence of volumetric growth delay? *American Journal of Neuroradiology*, **26**, 455–462.
- Steinberg, M.H. (2008) Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal*, **8**, 1295–1324.
- Stuart, M.J. & Nagel, R.L. (2004) Sickle-cell disease. *Lancet*, **364**, 1343–1360.
- Styles, L.A., Aarsman, A.J., Vichinsky, E.P. & Kuypers, F.A. (2000) Secretory phospholipase A(2) predicts impending acute chest syndrome in sickle cell disease. *Blood*, **96**, 3276–3278.
- Sugihara, K., Sugihara, T., Mohandas, N. & Heibel, R.P. (1992) Thrombospondin mediates adherence of CD36 + sickle reticulocytes to endothelial cells. *Blood*, **80**, 2634–2642.
- Trudel, M., De Paepe, M.E., Chrétien, N., Saadane, N., Jacmain, J., Sorette, M., Hoang, T. & Beuzard, Y. (1994) Sickle cell disease of transgenic SAD mice. *Blood*, **84**, 3189–3197.
- Viprakasit, V., Kankirawatana, S., Akarasereenont, P., Durongpisitkul, K., Chotewuttakorn, S. & Tanphaichitr, V.S. (2002) Baseline levels of plasma endothelin-1 (ET-1) and changes during transfusion in thalassemic patients. *American Journal of Hematology*, **70**, 260–262.
- Wahl, S. & Quirolo, K.C. (2009) Current issues in blood transfusion for sickle cell disease. *Current Opinion in Pediatrics*, **21**, 15–21.
- Walters, M.C., Nienhuis, A.W. & Vichinsky, E. (2002) Novel therapeutic approaches in sickle cell disease. *American Society of Hematology. Education Program*, 10–34.
- Wayne, A.S., Kevy, S.V. & Nathan, D.G. (1993) Transfusion management of sickle cell disease. *Blood*, **81**, 1109–1123.
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capellere-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P. & Descamps-Latscha, B. (1996) Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, **49**, 1304–1313.
- Wood, K.C., Hsu, L.L. & Gladwin, M.T. (2008) Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radical Biology and Medicine*, **44**, 1506–1528.

---

**Résumé:** La drépanocytose est, sous sa forme grave, une pathologie très invalidante pour les personnes qui en sont porteuses. Elle est rythmée par la récurrence de crises vaso-occlusives (CVO) et autres symptomatiques qui en découlent (accident vasculaire cérébral, syndrome thoracique aigu, hypertension pulmonaire, etc...). En participant, chez des sujets sains et pathologiques, à la limitation de certains facteurs impliqués dans les CVO (inflammation, adhésion vasculaire, stress-oxydatif), l'entraînement physique régulier pourrait hypothétiquement être bénéfique aux sujets drépanocytaires et participer à améliorer leurs qualités de vie. C'est l'hypothèse qui a été étudiée durant ce travail de thèse chez des sujets porteurs du trait drépanocytaire (PTD) puis sur un modèle de souris transgéniques drépanocytaires, les souris SAD.

La première étude a permis de montrer que des sujets PTD entraînés présentaient, au repos et en réponse à un exercice incrémental maximal, des concentrations en molécules solubles d'adhérence vasculaire (sVCAM-1) inférieures à celles des sujets PTD sédentaires. Ces concentrations sont par ailleurs comparables à celles de sujets sains. Ce résultat allant dans le sens d'une limitation de l'activation endothéliale par l'entraînement chez les PTD, des études plus poussées ont été réalisées sur les souris SAD. Deux études de caractérisation ont été nécessaires pour mettre en place notre expérimentation sur les souris SAD. La première a permis de valider un protocole de 8 semaines en roue d'activité physique volontaire sur des souris saines C57Bl/6. La deuxième a permis de caractériser le déclenchement de la CVO chez des souris SAD à l'aide d'un protocole d'hypoxie/réoxygénation (H/R) du point de vue de l'inflammation, l'adhérence vasculaire et du stress-oxydatif. Ces deux études ont alors permis la mise en place du dernier protocole de cette thèse : l'entraînement par roue d'activité physique volontaire des souris SAD. Huit semaines d'activité physique ont induit, chez les souris SAD entraînées, une limitation des dysfonctionnements endothéliaux induit par le stress d'H/R et observé chez les souris SAD sédentaires. Cette thèse tend donc à montrer que l'activité physique régulière pourrait être bénéfique pour les souris SAD en limitant certains facteurs impliqués dans la CVO. D'autres études seront nécessaires sur d'autres modèles murins drépanocytaires plus sévères et dans un plus long terme chez l'Homme pour adapter ces conclusions aux sujets drépanocytaires.

**Mots clés:** drépanocytose, souris transgéniques SAD, roue d'activité physique volontaire, hypoxie/réoxygénation, crise vaso-occlusive, adhésion vasculaire, stress-oxydatif.

---

### **Sickle cell disease and physical activity: consequences on the mechanisms involved in the vascular adhesion, inflammation and oxidative stress.**

---

**Abstract:** Sickle cell disease is, in its severe form, a very disabling disease. It is punctuated by recurrent vaso-occlusive crisis (VOC) which may induce other symptomatics (stroke, acute chest syndrome, pulmonary hypertension, etc ...). By participating, in healthy and pathological subjects, in the limitation of some factors involved in the VOC (inflammation, vascular adhesion, oxidative stress), habitual physical training could hypothetically be beneficial in subjects with sickle cell disease and participate in improving their quality of life. This hypothesis has been investigated during this thesis on sickle cell trait (SCT) carriers and on a transgenic sickle mice model, SAD mice.

The first study showed that trained SCT carriers displayed, at rest as in response to an incremental and maximal exercise, lower plasma vascular cell adhesion molecules (sVCAM-1) compared to sedentary SCT carriers. Moreover, these concentrations were similar to that of healthy subject. These results confirm a possible limitation of endothelial activation in SCT carriers. This potential beneficial effect has further been investigated in sickle SAD mice. Two characterization studies were necessary to establish our experiments on SAD mice: the first permitted to validate a 8 weeks voluntary wheel running (VWR) protocol on healthy C57Bl/6 mice while the second characterized the VOC induced by a hypoxia/reoxygenation (H/R) stress in SAD mice from the inflammation, vascular adhesion molecule and oxidative stress points of view. Thanks to these studies, a 8 weeks VWR protocol has been performed in SAD mice. Thus, physical activity permitted to reduce in VWR SAD mice the endothelial dysfunction induced by the H/R stress and observed in sedentary SAD mice. This thesis shows that habitual physical activity may be beneficial in sickle SAD mice in limiting some factors involved in VOC. Further studies will be necessary, on more severe sickle mice models and in a longer term in Humans, to adapt these findings to SCD subjects.

**Key words:** sickle cell disease, transgenic sickle SAD mice, voluntary wheel running, hypoxia/reoxygenation, vasoocclusive crisis, vascular adhesion, oxidative stress.