



HAL
open science

Étude des mécanismes impliqués dans l'inflammation, le stress oxydant et le métabolisme de l'oxyde nitrique chez des souris transgéniques drépanocytaires : approches sportive et pharmacologique

Emmanuelle Charrin

► **To cite this version:**

Emmanuelle Charrin. Étude des mécanismes impliqués dans l'inflammation, le stress oxydant et le métabolisme de l'oxyde nitrique chez des souris transgéniques drépanocytaires : approches sportive et pharmacologique. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1257 . tel-01443701v2

HAL Id: tel-01443701

<https://theses.hal.science/tel-01443701v2>

Submitted on 14 Apr 2017

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.



N° d'ordre NNT : 2016LYSE1257

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé ED 205

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie, Biologie, Santé
Discipline : Physiologie

Soutenue publiquement le 9 décembre 2016, par :
Emmanuelle CHARRIN

**Etude des mécanismes impliqués dans
l'inflammation, le stress oxydant et le
métabolisme de l'oxyde nitrique chez des souris
transgéniques drépanocytaires : approches
sportive et pharmacologique**

Devant le jury composé de :

Rapporteurs

Mme DUCHÉ Pascale, Professeure à l'Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand II

Mme LE VAN KIM Caroline, Professeure à l'Université Paris Diderot – Paris 7

Examineurs

M. OFORI-ACQUAH Solomon, Professeur à l'Université de Pittsburgh, PA, USA

M. REBOUL Cyril, Maître de conférences - Habilité à diriger des recherches à l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse

Directeur de thèse

M. MARTIN Cyril, Maître de conférences - Habilité à diriger des recherches à l'Université Claude Bernard Lyon 1

Equipe de recherche : Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité EA7424,
Equipe « Biologie Vasculaire et du Globule Rouge »

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique
Vice-président du Conseil d'Administration
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire
Vice-président de la Commission Recherche
Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID
M. le Professeur Didier REVEL
M. le Professeur Philippe CHEVALIER
M. Fabrice VALLÉE
M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTÉ

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux
Faculté d'Odontologie
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation
Département de formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Directeur : Mme la Professeure C.
BURILLON
Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Directeur : Mme la Professeure C.
VINCIGUERRA
Directeur : M. X. PERROT
Directeur : Mme la Professeure A-M.
SCHOTT

COMPOSANTES ET DÉPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies
Département Biologie
Département Chimie Biochimie
Département GEP
Département Informatique
Département Mathématiques
Département Mécanique
Département Physique
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et
Sportives
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon
Polytech Lyon
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI
Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Directeur : Mme C. FELIX
Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI
Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Directeur : M. G. PIGNAULT
Directeur : M. le Professeur C. VITON
Directeur : M. le Professeur A.
MOUGNIOTTE
Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité EA7424, dirigé par le Pr. Christian COLLET dans l'équipe « Biologie Vasculaire et du Globule Rouge » sous la direction du Dr. Cyril MARTIN.

Je tiens à remercier vivement tout d'abord l'ensemble des membres du jury, Pr. Pascale DUCHÉ, Pr. Caroline LE VAN KIM, Dr. Cyril REBOUL, Pr. Solomon OFORI-ACQUAH et Dr. Cyril MARTIN pour avoir accepté de lire et de juger ce travail et pour avoir été si arrangeants sur la date de soutenance

J'adresse un immense MERCI à mon directeur de thèse Cyril MARTIN pour son encadrement de qualité, sa patience et sa pédagogie. Merci Cyril de m'avoir fait confiance (et de m'avoir supportée !) pendant mes deux années de Master et mes trois années de Thèse. Je ne pouvais espérer réaliser ma thèse dans de meilleures conditions. Merci pour ta grande disponibilité et ta réactivité malgré la distance (entre Bordeaux, Pittsburgh et Lyon...). Merci de toujours m'avoir encouragée et de m'avoir fait prendre un peu plus confiance en moi. Merci également de m'avoir offert l'opportunité de passer un an aux States, ce fût une expérience incroyablement enrichissante autant sur le plan professionnel que personnel ! Et enfin merci de t'être démené pour trouver une date de soutenance qui convienne à tous et qui me permette de déposer mon dossier de qualif.

Je remercie aussi mes « autres chefs » Philippe CONNES, Vincent PIALOUX et Camille FAES. Merci pour votre aide précieuse pour la préparation des divers oraux (et y'a du boulot !) et votre réactivité qui a boosté ma rédaction d'articles en cette fin de thèse ! Phil, toujours de bon conseil et toujours prêt à blaguer aussi ! Merci pour ta bonne humeur à toutes épreuves qui rend le cadre de travail vraiment agréable et a grandement facilité l'écriture de ce manuscrit. Sache juste que je n'oublie pas la bouteille de vin portugais... Vincent, merci de m'avoir poussée à prendre de l'assurance au fil des années (et là encore y'a du boulot !). Merci pour ton optimisme sans failles et tous tes bons conseils autant pendant ma thèse que pour la préparation de l'après-thèse. Camille, un modèle de réussite pour nous tous ! Merci pour m'avoir si gentiment guidée dès le master et pendant mes débuts en tant que thésarde. Merci pour ta patience, pour les nombreux coups de mains et pour tous les « tips » que tu m'as donné sur les diverses expérimentations.

Je remercie vivement **Christian COLLET** pour m'avoir acceptée dans son laboratoire **LIBM** et de m'avoir fait une petite place dans ses locaux pourtant déjà bien occupés !

Un grand merci à mon pays d'accueil, les **USA** et plus particulièrement à mon labo d'accueil, celui du Dr. **Solomon OFORI-ACQUAH**. You kindly gave me the opportunity to come to the « so cold! » Pittsburgh and it was an amazing experience! I am very grateful to all the people in the lab who were truly nice and so welcoming! A huge thank-you to **Samit**, for your wise advices, for taking such good care of me, for guiding my first steps in the lab and helping with my experiments and for our talks on our respective homecountries. Thank you, **Rimi** and **Bueze**, for your natural happiness and for teaching me how to do Western Blot! Thank you, **Aisha**, for your kindness and for picking me at the airport at midnight, I would probably have slept at the airport that day if I had not run into you!! Thank you, **Diane**, for your "joie de vivre" and for your precious help with my experiments. Thank you, **Frances**, for giving me so many mice. My training experiments would not have been possible without you! Thank you, **Bethany**, for your extreme kindness and your tremendous help with all my experiments. Thank you, **Daniele**, for organizing outings and taking my mind off work! Thank you, **Amma**, for your unfailing happiness! A very special thank-you to **John**, it was a real pleasure to work by your side. Thank you for sharing your constant joy and for teaching me so much about exercise physiology. But above all, very special thanks to my second "thesis supervisor", **Solomon**. Heartfelt thanks for hosting me in your lab for an entire year, for your very warm welcome, for sharing your large knowledge on sickle cell disease and for being so available despite your amount of work. **MERCI BEAUCOUP A TOUS!**

Un grand merci aux membres de l'animalerie de l'IUT Lyon 1 dirigée par **Marie EL BABA** pour l'hébergement de nos souris sans lesquelles mes expérimentations n'auraient pu se faire. Je remercie plus particulièrement **Patrice DEL CARMINE** pour son implication non négligeable dans ce projet. Merci Patrice pour ta gentillesse, ta grande disponibilité et surtout pour ton immense patience lorsque tu as dû m'apprendre le gavage et les injections I.V., ce n'était pas une mince affaire mais tu as fait preuve d'une extrême pédagogie ! Merci de m'avoir transmis quelques-unes de tes compétences techniques et pour ton agréable compagnie. Merci également à **Amandine DALLEMAGNE** pour avoir pris, et pour continuer à prendre soin de nos petites souris !

Merci à **Laurent BEZIN** et à l'ensemble de son équipe « **TIGER** » pour m'avoir accueillie si souvent dans leur laboratoire. Un merci particulier à **Béatrice GEORGES** pour sa gentillesse et sa flexibilité qui m'a permis d'effectuer toutes mes qPCRs depuis mon master jusqu'à ma dernière année de thèse.

Merci à l'ensemble des membres du laboratoire **LEHNA** pour leur accueil toujours sympathique ! Un merci spécial à **Caroline ROMESTAING**. Si j'ai tenté le concours de l'**EDISS** c'est en grande partie grâce à toi, tu as su me transmettre ton enthousiasme pour la recherche et a su trouver les mots pour que je me lance ! Merci **Caro** pour ta gentillesse sans limites, ta disponibilité et la pédagogie dont tu as fait preuve aussi bien lorsque j'étais étudiante en **M1**, que lorsque je te demandais des conseils sur les **Western blots** pendant ma thèse!

Merci à l'équipe du **Pr. Bruno ALLARD**, et plus particulièrement à **Christine BERTHIER** pour sa gentillesse et pour les dépannages en azote liquide !

Merci à **Philippe JOLY** et **Céline RENOUX** pour tous les bons moments passés pendant les congrès d'**Arcachon**, **Paris** puis **Lisbonne**. Céline, si on allait manger des pastéis de **Nata** en chaussant le sanglier ?

Je remercie chaudement l'ensemble de mes collègues et « copains de galère » **Pauline MURY**, **Elodie SARUCO**, **Sarah SKINNER**, **Thiago KANTHACK**, **Paul HUISZON**, **Elie NADER**, **Mathilde MURA** pour leur soutien, l'agréable ambiance de travail qu'ils ont créé et pour les instants « détente » au détour d'un couloir ou autour d'un bon verre et d'un bon burger ! Merci **Pop** pour égayer mes journées passées au labo ! Tu as énormément de mérite pour partager mon bureau au quotidien, ça ne doit vraiment pas être facile ! Merci d'avoir été autant présente (virtuellement) pendant mes coups de mou aux **US** et pendant l'écriture de ce manuscrit. Merci **Elodie**, **Thiago**, **Sarah** et **Paul** pour répondre quasiment toujours présents aux sorties entre thésards qui m'ont plus d'une fois permis de sortir la tête du boulot et de passer d'excellents moments. Merci **Elie** pour l'aide précieuse sur les manip pendant cette dernière année et pour tous les bons délires qu'on a eu ensemble, je souhaite que ta thèse se déroule dans les mêmes conditions que la mienne ! Merci **Mathilde** pour ta bonne humeur et tes encouragements dans les débuts de l'écriture de ce manuscrit, bon courage pour la suite !

Ce travail ne serait rien sans le soutien inconditionnel de ma famille et de mes amis. Votre présence à mes côtés signifie énormément. Je ne pourrais espérer être mieux entourée. Merci à mes parents, **Véronique** et **Georges** pour **TOUT** ! Merci pour votre inestimable gentillesse, merci d'avoir toujours été là, de m'avoir laissé

emprunter la voie qui me plaisait et de m'avoir toujours encouragé malgré les longues années d'études. Merci à mes grandes sœurs, **Angé** et **Adé**, et à leur petite famille pour votre présence, pour tous nos moments de complicité et d'entraide. Merci pour votre écoute et votre bienveillance en toutes circonstances. Merci d'avoir pris soin de moi toutes ces années ! Merci à mes grand-parents **Camille** et **Louis** et à mes oncles et tantes, **Tchoune**, **Rony**, **Béa** et **Franck** pour m'avoir toujours soutenu quoiqu'il arrive. Merci pour votre accompagnement au fil des années, votre bonne humeur communicative et pour tous ces moments de convivialité que vous créez à chaque fois qu'on se voit ! Merci à tous mes cousins, cousines, **Savannah**, **Max**, **Charly**, **SuperFlu**, **Morgane**, **Alex** et **Sarah**, pour les super moments à délirer, pour toutes les sorties/activités qui m'ont permis de sortir la tête du boulot à maintes reprises ! Merci d'être présents tout simplement. Merci au « gang », **Cam**, **Lem** et **Mattxxx** pour me supporter depuis 10ans maintenant... Merci d'être de vrais amis sur lesquels je peux toujours compter autant dans les (nombreux) bons moments que dans les moments plus difficiles et ce, malgré la distance. Merci pour votre joie contagieuse et nos innombrables délires qui me libèrent la tête des petits tracas. Vous êtes parfaits ! Merci également à **Charlène**, **Lucie** et **Laetiti** pour toutes ces belles soirées à se goinfrer de schokobons, pour ces après-midis picnic dans le parc à se marrer comme des gamines de 5 ans, pour ces randos magnifiques qui me permettent de décompresser instantanément ! Merci pour votre écoute attentive pendant toutes ces années...

TABLE DES MATIERES

Figures du manuscrit	12
Tableaux du manuscrit	14
Abréviations	15
PARTIE 1 – Avant-propos	21
PARTIE 2 - Revue de littérature	25
I. LA DRÉPANOCYTOSE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES GÉNÉRAUX	26
A. GÉNÉRALITÉS SUR LE DRÉPANOCYTOSE	26
1. HISTORIQUE DE LA DRÉPANOCYTOSE	26
2. LA DRÉPANOCYTOSE : UNE MALADIE GÉNÉTIQUE DE L'HÉMOGLOBINE	27
3. STRUCTURE, FONCTION ET PHÉNOTYPE DE LA MOLÉCULE D'HÉMOGLOBINE	28
4. LE TRAIT DRÉPANOCYTAIRE	32
5. ORIGINE ET RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE DE LA MUTATION B ^S	32
6. PRÉVALENCE DE LA DRÉPANOCYTOSE	33
B. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DRÉPANOCYTOSE	35
1. POLYMÉRISATION/FALCIFORMATION	35
a. Concentration intra-érythrocytaire en Hémoglobine S	36
b. Courbe de dissociation de l'hémoglobine	37
c. Réversibilité	38
d. Phénomène compensatoire chez les patients S/S : la production de carboxyhémoglobine	39
2. ANÉMIE HÉMOLYTIQUE	40
a. Hémolyse extravasculaire	40
b. Hémolyse intravasculaire	41
3. CRISES VASO-OCCLUSIVES	43
a. Altérations hémorhéologiques	44
b. Altérations endothéliales	45
4. INFECTIONS BACTÉRIENNES	46
5. COMPLICATIONS CLINIQUES	47
a. Complications pulmonaires	47
b. Complications spléniques	48
c. Complications cardiovasculaires	49
d. Complications rénales	50
e. Complications hépatiques	51
f. Complications cérébro-vasculaires	52
g. Autres complications	53
h. Dichotomie des sous-phénotypes cliniques de la drépanocytose	54

C. TRAITEMENTS ACTUELS DE LA DRÉPANOCYTOSE	55
1. L'HYDROXYURÉE	55
2. LA TRANSFUSION SANGUINE	56
3. LA TRANSPLANTATION DE CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES	57
D. LES MODÈLES MURINS D'ÉTUDES EXPÉRIMENTAUX	57
1. MODÈLE SAD	57
2. MODÈLE TOWNES	61
3. LES AUTRES MODÈLES DE SOURIS TRANSGÉNIQUES DRÉPANOCYTAIRES	64
II. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES PATHOGÉNIQUES DE LA DRÉPANOCYTOSE: INFLAMMATION, STRESS OXYDANT ET BIODISPONIBILITÉ DU NO	66
A. LA DRÉPANOCYTOSE : UNE MALADIE INFLAMMATOIRE CHRONIQUE	66
1. L'INFLAMMATION ET L'ADHÉRENCE VASCULAIRE	66
2. LES CYTOKINES, MÉDIATEURS DE L'INFLAMMATION	68
3. DRÉPANOCYTOSE, CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES ET MOLÉCULES D'ADHÉRENCE	70
B. DRÉPANOCYTOSE ET ALTÉRATION DE LA BALANCE OXYDANTE	73
1. LE STRESS OXYDANT	73
a. <i>Les espèces réactives de l'oxygène</i>	73
b. <i>Sources physiologiques de ROS</i>	74
c. <i>Dommmages oxydants sur l'ADN, les lipides et les protéines</i>	78
2. LES SYSTÈMES ANTIOXYDANTS	79
a. <i>Les antioxydants enzymatiques</i>	79
b. <i>Les antioxydants non-enzymatiques</i>	81
c. <i>Le facteur de transcription clé des défenses antioxydantes : Nrf2</i>	82
3. LE DÉSÉQUILIBRE DE LA BALANCE ENTRE LES MÉCANISMES PRO- ET ANTIOXYDANTS DANS LA DRÉPANOCYTOSE	84
a. <i>L'auto-oxydation de l'HbS</i>	84
b. <i>L'hémoglobine libre</i>	85
c. <i>L'ischémie-reperfusion des CVOs</i>	85
d. <i>L'inflammation chronique</i>	86
C. MODULATION DE LA VASOMOTRICITÉ DANS LA DRÉPANOCYTOSE	86
1. L'ENDOTHÉLIUM, UN ACTEUR ESSENTIEL DE LA RÉGULATION DU TONUS VASOMOTEUR	86
a. <i>L'endothéline-1 : puissant agent vasoconstricteur</i>	87
b. <i>Le rôle vaso-relaxant de la prostacycline</i>	88
c. <i>L'oxyde nitrique : le vasodilatateur par excellence</i>	89
2. LA BIODISPONIBILITÉ DU NO DANS LA DRÉPANOCYTOSE	90
a. <i>La réaction délétère du NO avec l'anion superoxyde</i>	90
b. <i>L'impact de l'hémoglobine libre et de l'arginase sur la biodisponibilité du NO</i>	91
c. <i>Le découplage de la NO synthase endothéliale</i>	91

III. RÉPONSES INFLAMMATOIRES, OXYDANTES ET VASOMOTRICES À L'EXERCICE AIGU ET CHRONIQUE DANS LA DRÉPANOCYTOSE	92
A. RÉPONSES À L'EXERCICE AIGU EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES	92
1. ADAPTATIONS PHYSIOLOGIQUES À L'EXERCICE AIGU	92
a. Modifications hématologiques par l'exercice aigu	92
b. Impacts aigus de l'exercice sur les processus inflammatoires et d'adhérence vasculaire	93
c. Exercice aigu, stress oxydant et capacité antioxydante	95
d. Modulation du tonus vasomoteur par l'exercice aigu	97
2. EFFETS DE L'EXERCICE AIGU CHEZ DES PORTEURS D'HÉMOGLOBINE S	98
a. Réponses aigües à un exercice chez des porteurs du trait drépanocytaire	98
b. Réponses aigües à un exercice chez des sujets drépanocytaires homozygotes	101
B. RÉPONSES PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES À UN EXERCICE PHYSIQUE RÉGULIER	106
1. ADAPTATIONS PHYSIOLOGIQUES À L'EXERCICE PHYSIQUE CHRONIQUE	106
a. Effets chroniques de l'exercice sur les variables hématologiques et hémorhéologiques	106
b. Exercice chronique, inflammation et adhérence vasculaire	107
c. Influence de l'exercice chronique sur le stress oxydant	110
d. Adaptation du métabolisme du NO à l'entraînement	111
2. ADAPTATIONS À L'ENTRAÎNEMENT CHEZ DES PORTEURS D'HÉMOGLOBINE S	113
a. Réponses à l'exercice chronique chez les porteurs du trait drépanocytaire	113
b. Réponses à l'exercice chronique chez des sujets drépanocytaires homozygotes	115
IV. INFLUENCE DE LA VOIE DES RÉCEPTEURS AUX AGES SUR LE STRESS OXYDANT, L'INFLAMMATION ET LA BIODISPONIBILITÉ DU NO DANS LA DRÉPANOCYTOSE	117
A. MÉCANISMES D'ACTION DE LA VOIE AGE/RAGE	117
1. BIOCHIMIE DES AGES ET DES RAGES	117
a. La grande variété de produits avancés de la glycation (AGEs)	117
b. Le récepteur cellulaire aux AGEs : RAGE	118
2. EXPRESSION TISSULAIRE DE RAGE ET ACTIVATION PAR SES LIGANDS	119
B. EFFETS INTRACELLULAIRES PHYSIOLOGIQUES DE L'INTERACTION LIGAND-RAGE	120
1. LE COMPLEXE ENZYMATIQUE NADPH OXYDASE, CARREFOUR DE L'INTERACTION AGE/RAGE ET DU STRESS OXYDANT	120
2. L'IMPLICATION DES RAGES DANS L'INFLAMMATION ET L'ADHÉRENCE VASCULAIRE	121
a. Activation de la voie de signalisation du facteur de transcription NF- κ B	123
b. RAGE, Intégrine Mac-1 et adhérence vasculaire	123

3. RAGE ET FONCTION VASCULAIRE _____	124
4. LES AUTRES EFFETS DE L'ACTIVATION DES RAGES _____	125
C. L'INTERVENTION DES RAGES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DRÉPANOCYTAIRE	126
<u>PARTIE 3 - Contribution Personnelle</u>	<u>128</u>
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL _____	129
ÉTUDE 1 : Le stress oxydant est diminué chez des souris drépanocytaires SAD physiquement actives _____	133
ÉTUDE 2 : Etude des phénotypes inflammatoire et pro/antioxydant chez des souris drépanocytaires transgéniques Townes _____	148
ÉTUDE 3 : Un entraînement physique modéré diminue l'inflammation chez des souris drépanocytaires Townes _____	162
ÉTUDE 4 : Effets du blocage des RAGEs sur l'inflammation, le stress oxydant et le métabolisme de l'oxyde nitrique chez des souris transgéniques drépanocytaires Townes _____	194
<u>PARTIE 4 - Conclusion générale et perspectives</u>	<u>221</u>
CONCLUSION GÉNÉRALE _____	222
PERSPECTIVES _____	225
<u>PARTIE 5 - Références bibliographiques</u>	<u>228</u>
<u>PARTIE 6 – Valorisation</u>	<u>270</u>
<u>I. PUBLICATIONS</u>	<u>271</u>
1. PUBLICATIONS RÉFÉRENCÉES DANS PUBMED _____	271
2. ARTICLES SOUMIS _____	271
3. ARTICLES EN RÉDACTION _____	271
4. ABSTRACT DE CONFÉRENCE _____	271
<u>II. COMMUNICATIONS</u>	<u>272</u>
1. COMMUNICATIONS AFFICHÉES _____	272

2. COMMUNICATIONS ORALES	<u>272</u>
--------------------------	------------

PARTIE 7 – Annexes	274
---------------------------	------------

1. ANNEXE 1	<u>275</u>
2. ANNEXE 2	<u>279</u>
3. ANNEXE 3	<u>282</u>

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Cliché de microscopie observé par Herrick en 1910 montrant la forme particulière allongée de globules rouges	26
Figure 2. Mutation ponctuelle unique caractéristique de la drépanocytose	28
Figure 3. Structure de la molécule d'hémoglobine S	30
Figure 4. Chronologie de l'expression des différents variants des gènes de globine depuis le développement fœtal jusqu'à la 1ère année post-natale	31
Figure 5. Distribution des haplotypes de la drépanocytose	33
Figure 6. Distribution globale du gène de l'hémoglobine S	34
Figure 7. Formation d'un drépanocyte consécutive à la polymérisation de l'HbS en conditions désoxygénées	35
Figure 8. Altérations membranaires d'une cellule falciformée	36
Figure 9. Facteurs contrôlant le déplacement de la courbe de dissociation de l'hémoglobine	38
Figure 10. L'hémolyse entraîne la libération du contenu érythrocytaire dans la circulation qui participe à la pathogenèse de la drépanocytose	42
Figure 11. Modélisation d'une crise vaso-occlusive	44
Figure 12. Modèle séquentiel de déclenchement d'une crise vaso-occlusive proposé par Frenette	46
Figure 13. Exemple de clichés radiographiques montrant l'évolution d'un syndrome thoracique aigu (STA)	48
Figure 14. Localisation des différentes manifestations cliniques possibles de la drépanocytose	51
Figure 15. Hypothèse dichotomique des mécanismes à l'origine des manifestations cliniques de la drépanocytose	54
Figure 16. Construction des gènes α- et β-globine utilisés pour générer la souris SAD	58
Figure 17. Construction des gènes α-, β- et γ-globines de la souris Townes	62

Figure 18. Evolution de la transition des chaînes de globine au cours du développement chez la souris Townes	63
Figure 19. Etapes de l'internalisation d'une cellule inflammatoire dans un tissu	67
Figure 20. Effet de l'ischémie-reperfusion sur le système xanthine oxydo-réductase	75
Figure 21. Assemblage de la NADPH oxydase au niveau membranaire	76
Figure 22. Déterminants du découplage de la NO synthase	77
Figure 23. Systèmes antioxydants dans une cellule endothéliale	80
Figure 24. Effets du NO, de la prostacycline et de l'endothéline-1 sur le tonus vasomoteur	88
Figure 25. Métabolisme du NO dans la drépanocytose	89
Figure 26. Balance pro/antioxydants au repos vs. à l'exercice aigu	105
Figure 27. Balance pro/antioxydants à l'exercice aigu vs. à l'exercice chronique	109
Figure 28. Evolution du métabolisme du NO avec l'entraînement	113
Figure 29. Voies de formation des AGEs	118
Figure 30. Voie de signalisation du RAGE	122
Figure 31. Actions possibles de l'entraînement et de l'inhibition des RAGEs sur les paramètres physiopathologiques drépanocytaires	132
Figure 32. Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans les études portant sur les deux traitements appliqués chez les souris transgéniques drépanocytaires	224

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. <i>Thérapies actuelles disponibles pour les patients drépanocytaires</i>	56
Tableau 2. <i>Récapitulatif des similitudes et différences entre les caractéristiques des modèles murins et de l'Homme</i>	60
Tableau 3. <i>Variations de modulateurs de l'inflammation chez des populations drépanocytaires pédiatriques et adultes au cours d'une CVO comparés à des sujets drépanocytaires à l'état stable ou à des sujets sains</i>	72

ABRÉVIATIONS

¹O₂ : Oxygène moléculaire singulet

2,3-DPG : 2,3-Diphosphoglycérate

4-HNE : 4-Hydroxynonanal

8-OH-G : 8-Hydroxyguanosine

A

A/A : Sujet sain

A/S : Sujet porteur du trait drépanocytaire

AC : Adénylate Cyclase

ACSM : American College of Sports Medicine

ADMA : Asymmetric Dimethylarginine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADP : Adénosine Diphosphate

AG : Acide Gras

AGE : Advanced Glycation End products

ALT : Alanine aminotransférase

AMP : Adénosine Monophosphate

AMPc : AMP cyclique

AOPP : Advanced Oxidation Protein Products

ARE : Antioxidant Response Element

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

AST : Aspartate aminotransférase

ATP : Adénosine Triphosphate

ATS : American Thoracic Society

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

B

BH₂ : Dihydrobioptérine

BH₄ : Tétrahydrobioptérine

C

Ca²⁺ : Ion calcium

ClO⁻ : Ion hypochlorite

CML : Carboxyméthyllysine

CO : Monoxyde de carbone

COHb : Carboxyhémoglobine
CoQ : Coenzyme Q
CoQH[•] : Coenzyme Q réduit radicalaire
CoQH₂ : Coenzyme Q réduit stable
CPET : Cardio Pulmonary Exercise Testing
CRP : Protéine C-réactive
CuZn-SOD : Superoxyde dismutase cuivre-zinc
CVO : Crise Vaso-Occlusive

D

DAMPs : Damage-Associated Molecular Pattern molecules
DOLD : Deoxyglucosone-Lysine Dimer

E

EC-SOD : Superoxyde Dismutase extracellulaire
eNOS : Oxyde Nitrique Synthase endothéliale
ET-1 : Endothéline-1

F

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide
FC : Fréquence Cardiaque
FCmax : Fréquence Cardiaque maximale
FDA : Food and Drug Administration
Fe²⁺ : ion ferreux
Fe³⁺ : Ion ferrique
Fe(OH)₃ : Hydroxyde de fer
FMN : Flavine Monoclucléotide
FoxO : Forkhead box protein O
FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power

G

γ-GCL : γ-Glutamyl Cysteine Ligase
G6PD : Glucose 6-Phosphate Déshydrogénase
GLUT4 : Glucose Transporter 4
GMPc : Guanosine Monophosphate cyclique
GOLD : Glyoxal-Lysine Dimer
GPx : Glutathion Peroxydase
GR : Globule Rouge

GSH : Glutathion réduit
GSR : Glutathion réductase
GSSG : Glutathion oxydé
GTP : Guanosine Triphosphate

H

H/R : Hypoxie/Réoxygénation
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
Hb : Hémoglobine
HbA : Hémoglobine adulte saine
HbF : Hémoglobine Fœtale
HbS : Hémoglobine S drépanocytaire
HIF-1 α : Hypoxia-Inducible Factor-1 α
HMGB-1 : High-Mobility Group Box-1 protein
HO-1 : Hème Oxygénase-1
HVR : Ratio Hématocrite/Viscosité sanguine

I

I/R : Ischémie/Reperfusion
ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule-1
IFN : Interféron
I κ B : nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) inhibitor
IKK : I κ B Kinase
IL : Interleukine
IL-1R : Récepteur à l'Interleukine-1
iNOS : Oxyde Nitrique Synthase inductible

K

Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein-1
KCC : Canal ionique potassium chlorure
KO : Knock-Out

L

L-Arg : L-Arginine
L-Cit : L-Citrulline
LCR : Locus Control Region
LDH : Lactate déshydrogénase
LO₂ : AG peroxydé

LOOH : AG réduit

M

Mac-1 : Macrophage antigen-1

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MDA : Malondialdéhyde

MetHb : Méthémoglobine

MnSOD : SOD manganèse

MOLD : Methylglyoxal Lysine Dimer

MP₄CO : Hémoglobine humaine conjuguée à du polyéthylène glycol, saturée en CO

N

NADP⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate oxydé

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit

NCAA : National Collegiate Athletic Association

NF- κ B : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NK : Cellule immunitaire « Natural Killer »

nNOS : Neuronale NO Synthase

NO : Oxyde Nitrique

NO₂ : Dioxyde d'azote

NO₃⁻ : Ion nitrate

NO_x : Métabolites nitrite/nitrate

NOX : NADPH oxydase

NQO-1 : NADPH Quinone Oxydoréductase-1

Nrf2 : Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2

O

O₂ : Oxygène moléculaire

O₂⁻ : Anion superoxyde

O₂Hb : Oxyhémoglobine

OH \cdot : Radical hydroxyle

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONOO⁻ : Peroxynitrite

P

PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Pattern molecules

PCO₂ : Pression partielle en dioxyde de carbone

PECAM-1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1

PGE₂ : Prostaglandine E₂
PGI₂ : Prostacycline (=Prostaglandine I₂)
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
PO₂ : Pression partielle en dioxygène
PRR : Pattern Recognition Receptor
PRx : Peroxyrédoxine
PSGL-1 : P-sélectine Glycoprotéine Ligand-1
PTD : Porteur du Trait Drépanocytaire

R

RAGE : Receptor of Advanced Glycation End products
RCPG : Récepteur Couplé à une Protéine G
ROO- : Radical Peroxyle
ROS : Reactive Oxygen Species

S

S/C : Patient drépanocytaire hétérozygote composite porteur d'HbS et d'HbC mutées
S/S : Patient drépanocytaire homozygote
sGC : Guanylate Cyclase soluble
SOD : Superoxyde dismutase
STA : Syndrôme Thoracique Aigu = ACS : Acute Chest Syndrom
SV1 : Seuil Ventilatoire 1

T

TBARS : Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TF : Tissue Factor
TGF-β : Transforming Growth Factor-β
Th1 : Lymphocyte T helper 1
TLR4 : Toll Like Receptor-4
TNF-α : Tumor Necrosis Factor-α
TNF-R : Récepteur au TNF-α
TR : Thiorédoxine Réductase
TRx : Thiorédoxine oxydée
TRx-H₂ : Thiorédoxine réduite

V

VCAM-1 : Vascular-Cell Adhesion Molecule-1
V_D/V_T : Ratio Volume mort/Volume courant (=Dead Volume/Tidal Volume)

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Vit C : Vitamine C

Vit E : Vitamine E

VLA-4 : Very Late Antigen-4

$\dot{V}O_2\text{max}$: Consommation maximale d'oxygène

X

XDH : Xanthine Déshydrogénase

XO : Xanthine Oxydase

PARTIE 1

-

AVANT-PROPOS



Manue

Il est aujourd'hui estimé qu'il naît chaque année dans le monde, plus de 300 000 enfants atteints de drépanocytose, une forme grave d'hémoglobinopathie à transmission autosomique récessive. Cette maladie se caractérise par une altération de la forme native du globule rouge suite à la formation de polymères d'hémoglobine S mutée. Elle se manifeste alors par une anémie hémolytique sévère et chronique, par un risque infectieux prononcé ainsi que par la formation d'occlusions vasculaires multifocales, hyperalgiques et quasiment imprévisibles. Ces altérations d'origine vasculaire ont pour conséquences directes des atteintes organiques multiples pouvant engendrer ponctuellement un syndrome thoracique aigu, des séquestrations spléniques et des thromboses/hémorragies rénales, hépatiques et cérébrales qui risquent d'évoluer ensuite en hypertension pulmonaire, insuffisance cardiaque et rénale, hépatopathie et accidents vasculaires cérébraux. Ainsi la très grande variété de complications organiques aiguës ou chroniques qui évoluent suivant l'âge mais surtout suivant l'individu rend l'établissement d'un traitement particulièrement complexe. De ce fait, il n'existe à ce jour aucune thérapie curative, efficace et applicable à grande échelle.

D'un point de vue moléculaire, l'apparition des manifestations cliniques de la maladie sont imputables à la mise en place d'un cercle vicieux impliquant un stress oxydant exacerbé, une inflammation chronique et une altération de la vasomotricité médiée par l'inactivation de l'oxyde nitrique. Ces mécanismes physiopathologiques risquent d'être amplifiés par certaines situations particulièrement stressantes pour l'organisme telles que l'hypoxie, l'acidose, l'hyperthermie et la déshydratation, autant de paramètres induits par l'exercice physique. Pour ces raisons, les professionnels de santé déconseillent généralement la pratique d'une activité sportive à leurs patients drépanocytaires. Néanmoins, depuis quelques années, plusieurs études font état d'une absence de complications et d'effets délétères majeurs chez des patients drépanocytaires en réponse à un exercice aigu sous-maximal et maximal. De façon similaire, des travaux montrant les puissants effets antioxydants, anti-inflammatoires

et vasodilatateurs de l'exercice physique régulier chez la population générale ainsi que chez des patients atteints de maladies chroniques se multiplient. Récemment, une modulation bénéfique du statut rédox, de la fonction endothéliale et de la rhéologie du sang par l'entraînement physique a également été mise en évidence chez des porteurs du trait drépanocytaire (sujets hétérozygotes pour la mutation). Pourtant, malgré les multiples actions favorables apparentes de l'entraînement physique, l'impact physiologique de ce dernier ainsi que son potentiel effet thérapeutique sur des patients drépanocytaires homozygotes n'a pas encore été étudié.

En parallèle, le stress oxydant excessif caractéristique de la drépanocytose est susceptible de générer et d'être généré par la grande famille des produits finaux de glycation (AGEs, Advanced Glycation End Products). Après fixation sur leur récepteur (RAGE, Receptor of AGE), ces composés formés à partir de l'oxydation et de la glycation non-enzymatique de protéines et de lipides participent à la physiopathologie rénale, hépatique, cardiovasculaire et pulmonaire du diabète de type 2 et de nombreuses autres maladies inflammatoires chroniques. Les mécanismes moléculaires sous-jacents impliquent une production accrue de cytokines pro-inflammatoires, de molécules d'adhérence vasculaire et d'agents pro-oxydants ainsi qu'une altération du métabolisme de l'oxyde nitrique. Autant de paramètres qui contribuent à la pathogénèse de la drépanocytose. L'implication des RAGE dans la maladie n'a toutefois pas été testée.

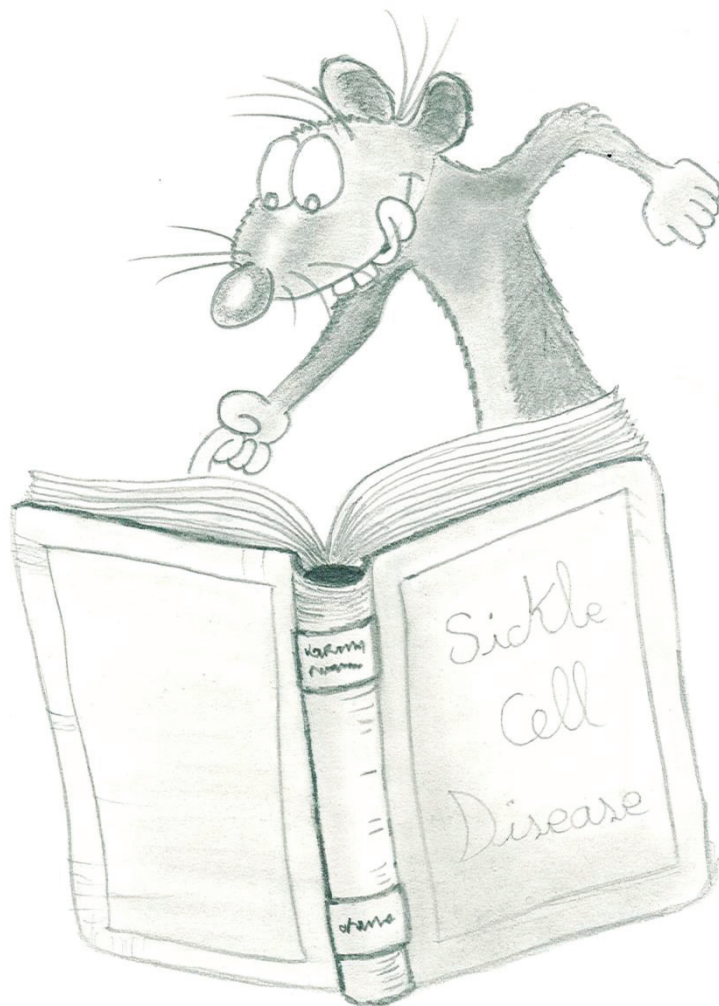
Au regard de ces constats, les objectifs principaux de ce travail de thèse sont 1) de déterminer les effets de l'entraînement physique les processus inflammatoires, pro/antioxydants et sur le métabolisme du NO dans la drépanocytose et 2) de déterminer le rôle des RAGEs dans l'entretien du cercle vicieux drépanocytaire. L'ensemble des travaux réalisés pour répondre à ces deux hypothèses a été effectué sur des modèles murins de drépanocytose et s'articule autour de l'évaluation des marqueurs de l'inflammation, du stress oxydant et du métabolisme du NO en

réponse à des interventions sportive ou pharmacologique. Ainsi la première étude s'intéresse aux effets d'un exercice physique chronique volontaire chez des souris SAD, présentant un phénotype modéré de la maladie, qui ont été soumises à un stress vaso-occlusif. La seconde consiste en une étude descriptive préliminaire du profil moléculaire inflammatoire et du stress oxydant à l'état basal chez des souris Townes, modèle particulièrement sévère de drépanocytose. Enfin les études 3 et 4 rapportent les actions respectives d'un entraînement à intensité modérée et d'un blocage pharmacologique des RAGEs chez ce même modèle de souris aux atteintes organiques multiples.

PARTIE 2

—

Revue de littérature



Manne

I. LA DRÉPANOCYTOSE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES GÉNÉRAUX

A. GÉNÉRALITÉS SUR LE DRÉPANOCYTOSE

1. Historique de la drépanocytose

Le premier cas de drépanocytose a été décrit par le Dr R. Leiby en 1846. Il a pratiqué une autopsie sur un patient afro-américain exécuté pour meurtre chez lequel la rate était absente. En 1910, le Dr J. B. Herrick reçoit un patient âgé de 20 ans souffrant de difficultés respiratoires, de douleurs musculaires et gastriques, qui souffrait également d'ulcères aux jambes et de fatigue chronique (Herrick, 2001). Herrick observa un nombre anormalement faible de globules rouges normaux et un fort taux de globules fins et longilignes ressemblant à des faucilles (« Sickles » en anglais ; Figure 1). Herrick est le premier à décrire l'anémie à cellules falciformes. En 1917, Victor Emmel découvre le caractère héréditaire (qui sera confirmé par John Huck en 1923) de la maladie en étudiant le sang d'une patiente et de son père. Le

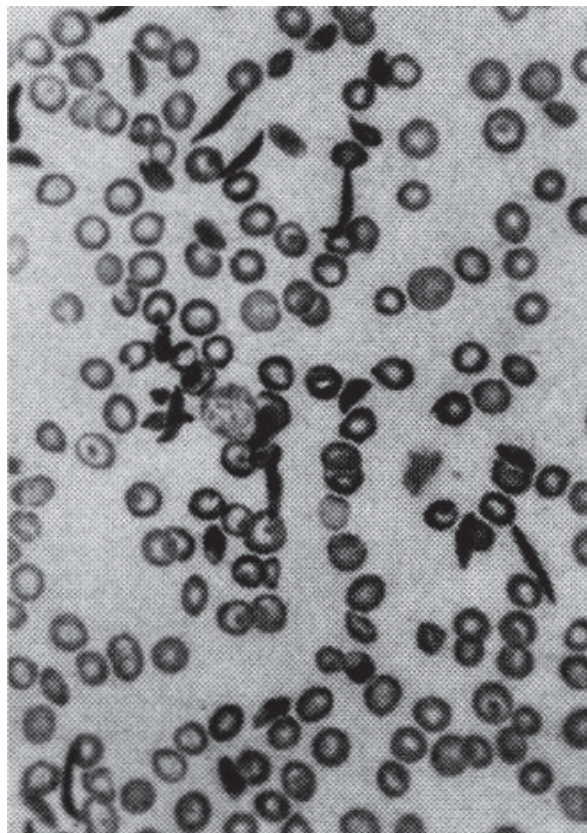


Figure 1. Cliché de microscopie observé par Herrick en 1910 montrant la forme particulière allongée de globules rouges.
Extrait de (Herrick, 2001).

sang du père contenait quelques cellules falciformes. Il découvre également que trois autres enfants de cette famille étaient décédés à un jeune âge et souffraient tous d'une anémie sévère (Emmel, 1917). Dans la décade suivante, le Dr L. Diggs distingue les patients avec symptômes (« active sicklers »), des personnes asymptomatiques (« latent sicklers »). Il utilise alors le terme de « trait drépanocytaire » (« Sickle Cell trait ») pour décrire un phénotype avec une faible concentration de globules rouges falciformes (Serjeant, 2001). Dans les années 40, l'implication de l'hémoglobine est constatée, notamment grâce aux travaux de Pauling et Itano qui ont montré une différence structurale entre l'hémoglobine de sujets sains (essentiellement l'hémoglobine A) et celle de patients drépanocytaires, ces derniers exprimant majoritairement une forme mutée de l'hémoglobine appelée hémoglobine S (Pauling and Itano, 1949). La drépanocytose est pour la première fois décrite comme une « maladie moléculaire ». En 1956, Ingram décrit une divergence dans la migration électrophorétique des deux hémoglobines. Après digestion chimique, un des peptides de l'hémoglobine S semble être chargé positivement lorsque le même peptide de l'hémoglobine A n'est pas chargé à pH identique (Ingram, 1956). L'année suivante, il identifie l'unique mutation responsable de la maladie : un acide glutamique est remplacé par une valine dans l'hémoglobine S (Ingram, 1957). Il faudra attendre 1977 pour localiser la substitution d'une adénine par un uracile sur le 6^{ème} codon de l'ARNm de l'hémoglobine S (Marotta et al., 1977). L'année suivante, Deisseroth *et al.* découvrent la position des β et γ globines sur le chromosome 11 chez l'Homme (Deisseroth et al., 1978).

2. La drépanocytose : une maladie génétique de l'hémoglobine

La drépanocytose est l'une des maladies monogéniques héréditaires la plus répandue au monde. Elle est causée par l'unique substitution d'une adénine par une thymine sur le 6^{ème} codon du gène codant pour l'hémoglobine. Cette mutation entraîne la traduction d'une valine à la place d'un acide glutamique. Le caractère hydrophobe de la valine modifie la conformation de la protéine d'hémoglobine,

formant des tétramères lorsque l'environnement est pauvre en oxygène. Les tétramères interagissent alors pour former des polymères d'hémoglobine S qui rigidifient le globule rouge prenant une forme de faucille, on parle alors de falciformation érythrocytaire. L'accumulation de globules rouges non-déformables peut entraîner l'occlusion de vaisseaux, notamment des capillaires ayant un diamètre inférieur aux globules rouges (4-5 μm contre 7-8 μm), générant ainsi des territoires organiques ischémiques. Cette moindre déformabilité est associée à une fragilité accrue des érythrocytes. En effet, les drépanocytes sont caractérisés par une dissociation entre le squelette sous-membranaire et la membrane érythrocytaire (Franck et al., 1985), entraînant une anémie hémolytique chronique chez les patients drépanocytaires. Ces deux manifestations, vaso-occlusion et anémie hémolytique, sont à l'origine d'altérations poly-organiques (poumons, reins, foie, rate, muscles...) causées par la réduction voire l'absence d'oxygénation des tissus.

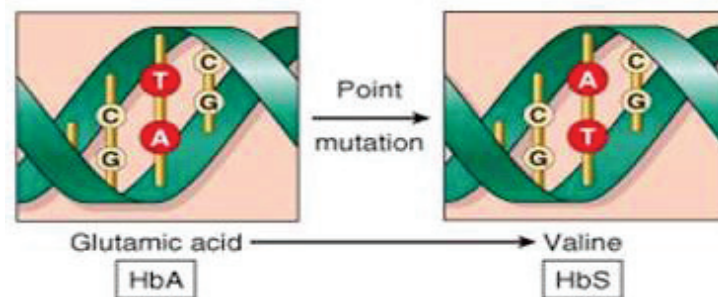


Figure 2. Mutation ponctuelle unique caractéristique de la drépanocytose.

Le remplacement d'une base adénine par une base thymine sur le 6^{ème} codon du gène de la β -globine aboutit à la traduction d'une valine à la place d'un acide glutamique. Extrait de (Kumar, 2009).

3. Structure, fonction et phénotype de la molécule d'hémoglobine

L'hémoglobine est une protéine hétérotétramérique composée de groupements hème et de chaînes de globine. Chacun des quatre hèmes dispose d'un noyau circulaire porphyrine sur lequel se fixe un ion fer capable d'interagir de façon réversible avec une molécule de dioxygène (Figure 3). Il existe différents variants de globine formant différents types d'hémoglobine et dont l'expression évolue au cours du développement chez l'Homme. Ainsi pendant la phase embryonnaire intra-

utérine, l'embryon exprime les globines ϵ et ζ (Figure 4). Cette dernière est remplacée par l' α -globine depuis le stade foetal et perdure à l'âge adulte. La production de globine ϵ est supplantée par celle de la γ -globine chez le fœtus (McConnell et al., 2011).

L'association de deux chaînes d' α -globines et de deux chaînes de γ -globine ($\alpha_2\gamma_2$) permet la formation de l'**hémoglobine foetale** (HbF), qui représente 90% de l'hémoglobine totale exprimée à ce stade. Cette hémoglobine a une forte affinité pour le dioxygène facilitant le passage de ce dernier à travers la barrière foeto-maternelle. Quelques mois après la naissance, la production de γ -globine décline pour laisser place à la β -globine, permettant la synthèse d'**hémoglobine adulte** (HbA, $\alpha_2\beta_2$). L'HbF est toujours produite à l'état de trace chez les adultes sains (moins d'1% de l'hémoglobine totale) (Schechter, 2008). Chez les patients drépanocytaires homozygotes, le remplacement de l'HbF par l'HbS est tardif et la concentration en HbF est généralement plus élevée chez ces patients (5-8% en moyenne à l'âge adulte) par rapport à des sujets sains (Akinsheye et al., 2011). Cette élévation d'HbF pourrait conférer une certaine cytoprotection en diluant la concentration en HbS et en interférant avec sa polymérisation et donc avec la falciformation. Ainsi de fortes concentrations en HbF sont associées à une diminution de la fréquence d'épisodes douloureux, d'ulcères de jambes et de syndromes thoraciques aigus, une moindre ostéonécrose, une réduction de la sévérité de la maladie et un maintien de la fonction splénique (Akinsheye et al., 2011; Pack-Mabien and Imran, 2013). L'augmentation de l'HbF est donc corrélée à une morbidité et une mortalité réduites dans la drépanocytose.

Outre l'altération qualitative de l'hémoglobine (dont sont victimes les patients drépanocytaires), il existe aussi des anomalies quantitatives de l'hémoglobine regroupées sous le nom de thalassémies. On distingue alors les α -thalassémies des β -thalassémies correspondant respectivement à une production défectueuse en α -globine ou en β -globine.

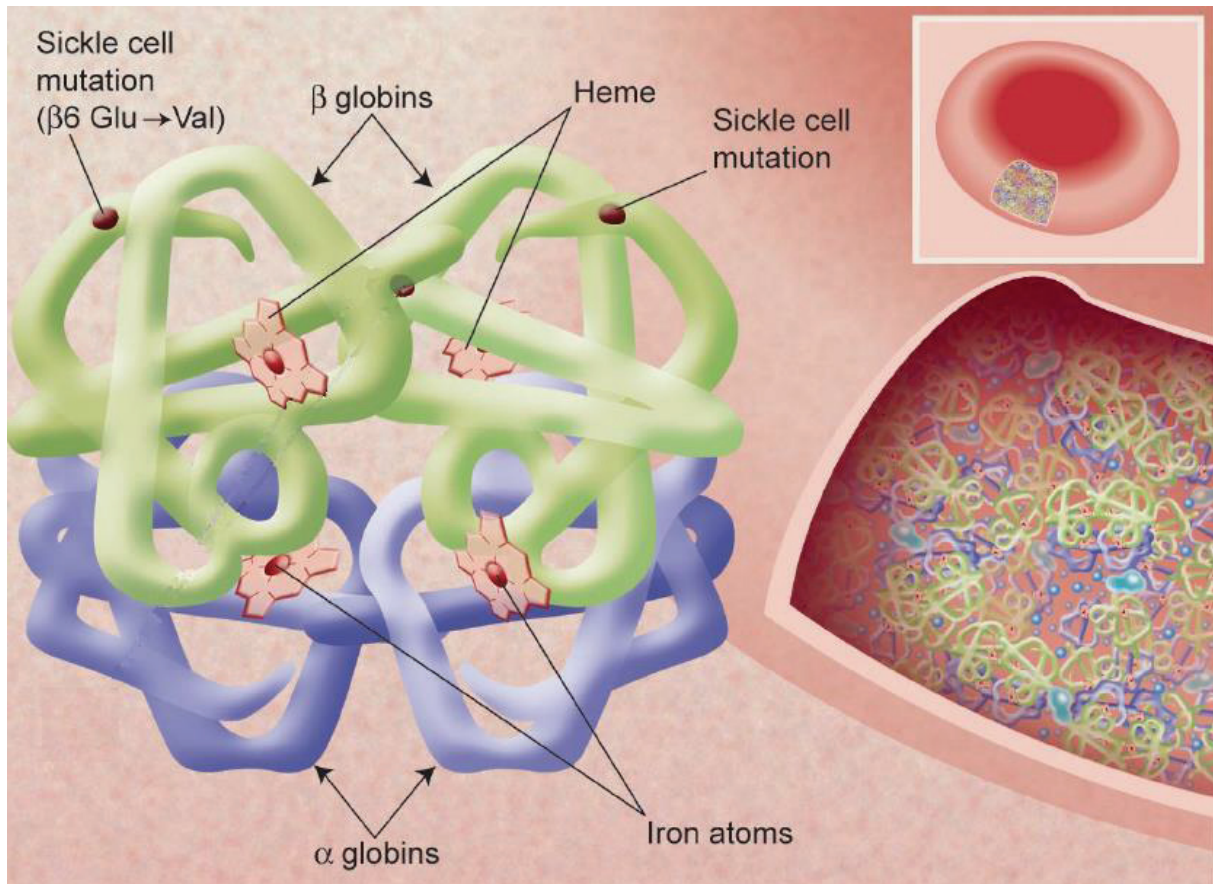


Figure 3. Structure de la molécule d'hémoglobine S.

La molécule d'hémoglobine S doit sa forme tétramérique à deux chaînes α et deux chaînes β mutées sur le 6^{ème} codon. Un groupement hème associé à un atome de fer est fixé sur chacune des chaînes de globine. Tiré de (Schechter, 2008).

L' **α -thalassémie** est le résultat d'une faible production (notée α^+) voire d'une absence totale (notée α^0) d' α -globine. Dans les formes les plus sévères, il peut se former deux types d'hémoglobines homotétramériques, l'HbH, composée uniquement de chaînes β et l'Hb-*Barth's* avec 4 chaînes γ qui ont toutes deux une très forte affinité pour l'oxygène amenuisant donc l'apport en dioxygène aux tissus. L'expression d'HbH est à l'origine d'une anémie hémolytique modérée et d'une splénomégalie tandis que l'expression d'Hb-*Barth's* est associée à une mortalité *in utero* ou néonatale précoce. *A contrario*, l'expression d'une forme modérément sévère d' α -thalassémie serait protectrice chez les drépanocytaires homozygotes en diminuant la concentration intra-érythrocytaire d'HbS et donc la sévérité de l'anémie (Steinberg and Embury, 1986). Il semblerait également qu'elle potentialise les effets de l'hydroxyurée sur la limitation des épisodes vaso-occlusifs (Darbari et al., 2014). De

plus, l' α -thalassémie s'est avérée avoir des effets bénéfiques chez les sujets hétérozygotes, sur le plan hémorhéologique (Monchanin et al., 2005), inflammatoire (Monchanin et al., 2007) et du stress oxydant (Faes et al., 2012).

La **β -thalassémie** a pour conséquence un manque de β -globine (incomplet : β^+ ou total : β^0) compensé par une production excessive des chaînes d' α -globine qui ont tendance à précipiter, entraînant érythropoïèse anormale et hémolyse (Staikou et al., 2014). De même que pour l' α -thalassémie, la β -thalassémie peut-être associée à la drépanocytose. Ainsi la forme β^S/β^0 est généralement cliniquement indiscernable de la drépanocytose homozygote (β^S/β^S) puisque seule la chaîne β^S est synthétisée (Serjeant et al., 2011). L'expression d'une forme β^S/β^+ correspond à une synthèse limitée d'HbA. Le phénotype est plus hétérogène car dépend de la quantité d'HbA produite mais est généralement plus sévère qu'une hétérozygotie β^A/β^S mais moins qu'une homozygotie β^S/β^S (Steinberg, 2008).

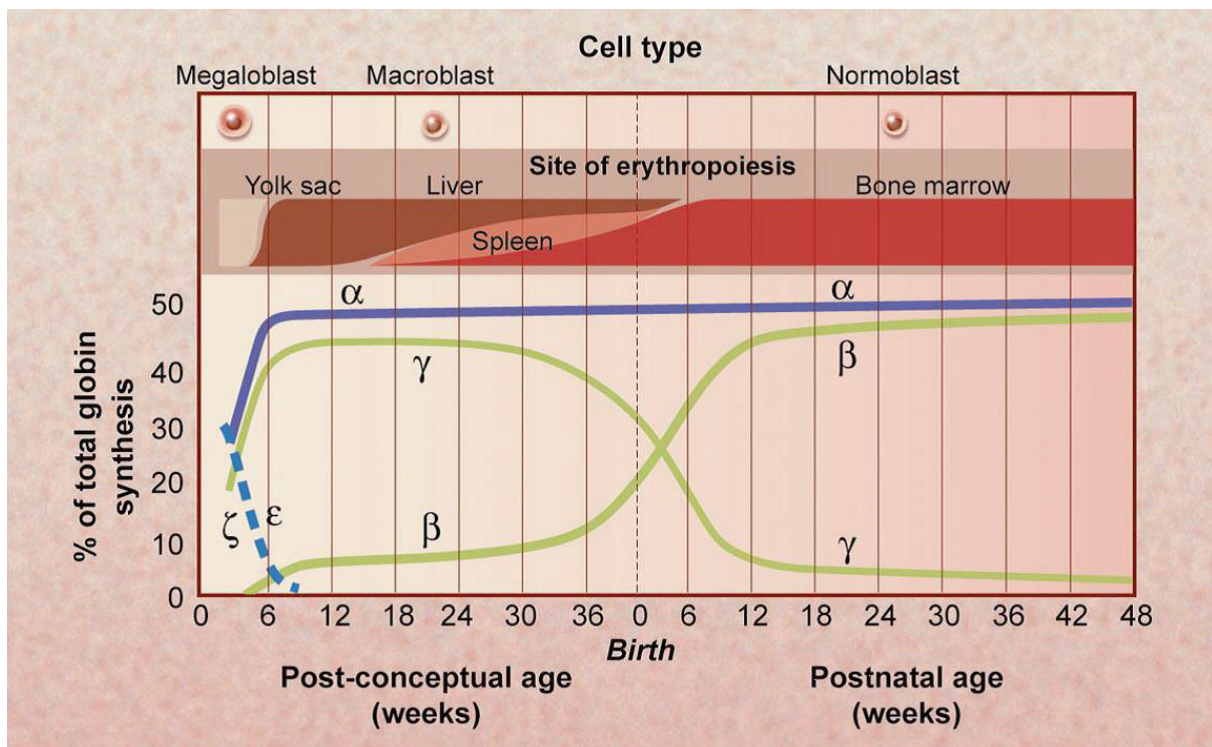


Figure 4. Chronologie de l'expression des différents variants des gènes de globine depuis le développement fœtal jusqu'à la 1^{ère} année post-natale. Sont représentés également, les sites majeurs d'érythropoïèse et types cellulaires contenant l'hémoglobine aux différents stades de développement. Extrait de (Schechter, 2008).

4. Le Trait Drépanocytaire

Le trait drépanocytaire correspond à la forme hétérozygote de la drépanocytose. Les porteurs de ce trait (PTD) possèdent donc une copie du gène β^S muté et une copie du gène β^A sauvage. Cette condition est communément considérée comme asymptomatique puisque les PTD affichent un taux d'HbS inférieur à 50% (entre 20 et 45%) ainsi qu'une croissance (Kramer et al., 1978), une morbidité et une mortalité comparables à des sujets homozygotes sains A/A (Gima and Bemis, 1975). Pourtant l'émergence d'études rapportant des anomalies hématologiques (Westerman et al., 2002), hémorhéologiques (Monchanin et al., 2005), cardiovasculaires (Ould Amar et al., 1999) et spléniques (Lane and Githens, 1985) chez les PTD, notamment lorsqu'ils sont confrontés à des conditions physiquement exigeantes, amène la population scientifique et médicale à reconsidérer le statut bénin du trait drépanocytaire (Connes et al., 2007; Le Gallais et al., 2007). Une étude récente alimente d'ailleurs cette discussion en montrant que le trait drépanocytaire majore les anomalies de la fonction vasculaire habituellement observées chez les patients atteints d'un diabète de type 2 (Diaw et al., 2015a), ce qui pourrait accroître le risque de survenue de complications cardiovasculaires.

5. Origine et répartition géographique de la mutation β^S

Historiquement, 5 foyers de départ de la mutation drépanocytaire ont été identifiés, 4 en Afrique (Sénégal, Bantu, Bénin et Cameroun) et 1 en Asie (Arabo-Indien) (Figure 5). A la fin des années 40, une hypothèse selon laquelle ces foyers de forte concentration de l'HbS coïncideraient avec la distribution du paludisme, a été formulée (Haldane, 1949). Les individus hétérozygotes A/S bénéficieraient d'une protection élevée contre le paludisme comparés aux sujets sains A/A sensibles au parasite *Plasmodium falciparum* dans les régions endémiques pour le paludisme et aux malades S/S protégés du parasite mais mourant prématurément de la drépanocytose. Suite aux importants mouvements de populations africaines durant la traite des noirs, puis à l'essor des flux migratoires, la distribution du gène β^S a évolué

indépendamment de celle du paludisme rendant difficile la vérification de l'hypothèse initialement proposée. Malgré tout, Piel et collaborateurs (Piel et al., 2010) ont réalisé une méta-analyse regroupant les données épidémiologiques de plus de 1200 études et ont pu confirmer l'hypothèse formulée par Haldane en 1949 (Figure 6). La relative protection des PTD face au parasite serait due d'une part, à la diminution du pH des cellules infectées facilitant la destruction des GRs et donc interrompant le cycle de vie du parasite et d'autre part à la faible concentration intracellulaire en potassium des GRs portant l'HbS conduisant également à la mort du parasite (Friedman et al., 1979).

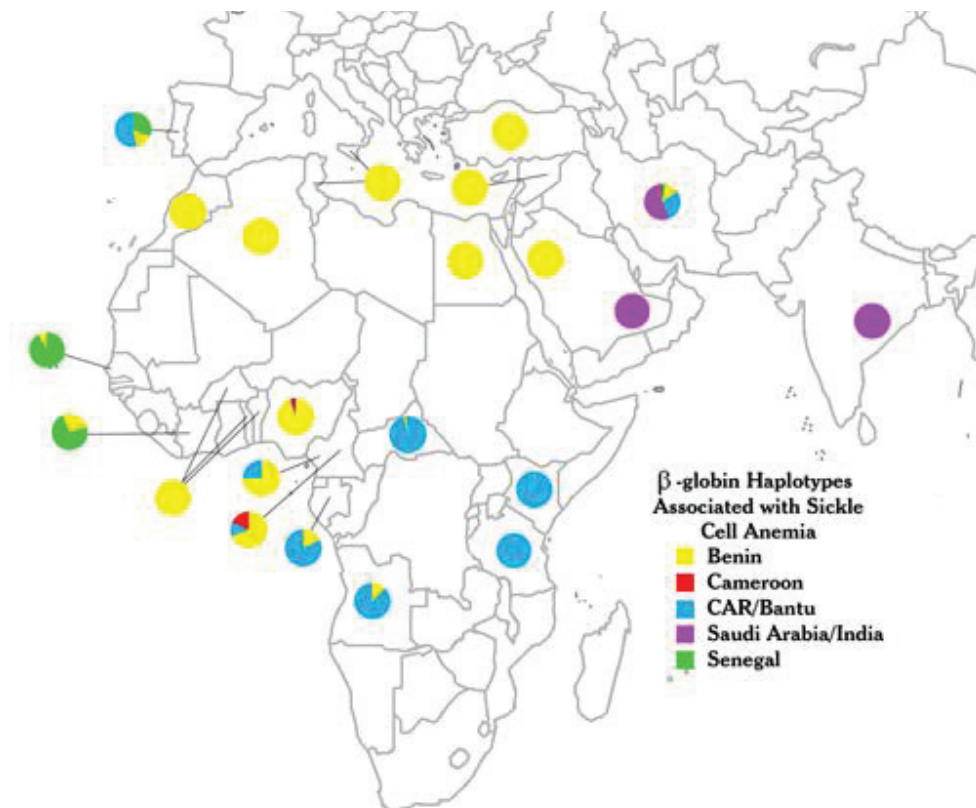


Figure 5. Distribution des haplotypes de la drépanocytose.

Chaque couleur représente un haplotype nommé après le pays dans lequel il a été originellement découvert. CAR: Central African Republic. Extrait de (Gabriel and Przybylski, 2010).

6. Prévalence de la drépanocytose

Dans une revue détaillée publiée dans Lancet, Piel *et al.* estiment à plus de 5 millions, le nombre de naissances d'individus hétérozygotes A/S et 312 000 nouveaux homozygotes S/S à travers le monde (Piel et al., 2013).

Dans un bulletin publié en décembre 2014, l'INSERM fait état de 441 nouveaux atteints d'un syndrome drépanocytaire majeur (englobant S/S, S/ β thal⁰, S/ β thal⁺ et S/C) au cours de l'année 2013. Ce chiffre représente une naissance sur 1900 faisant de la drépanocytose la maladie génétique la plus fréquente en France (bien au-delà des maladies génétiques plus connues du grand public, telles que la myopathie de Duchenne (1/3500 ; chiffre AFM) ou la mucoviscidose (1/4500 ; chiffre INSERM)).

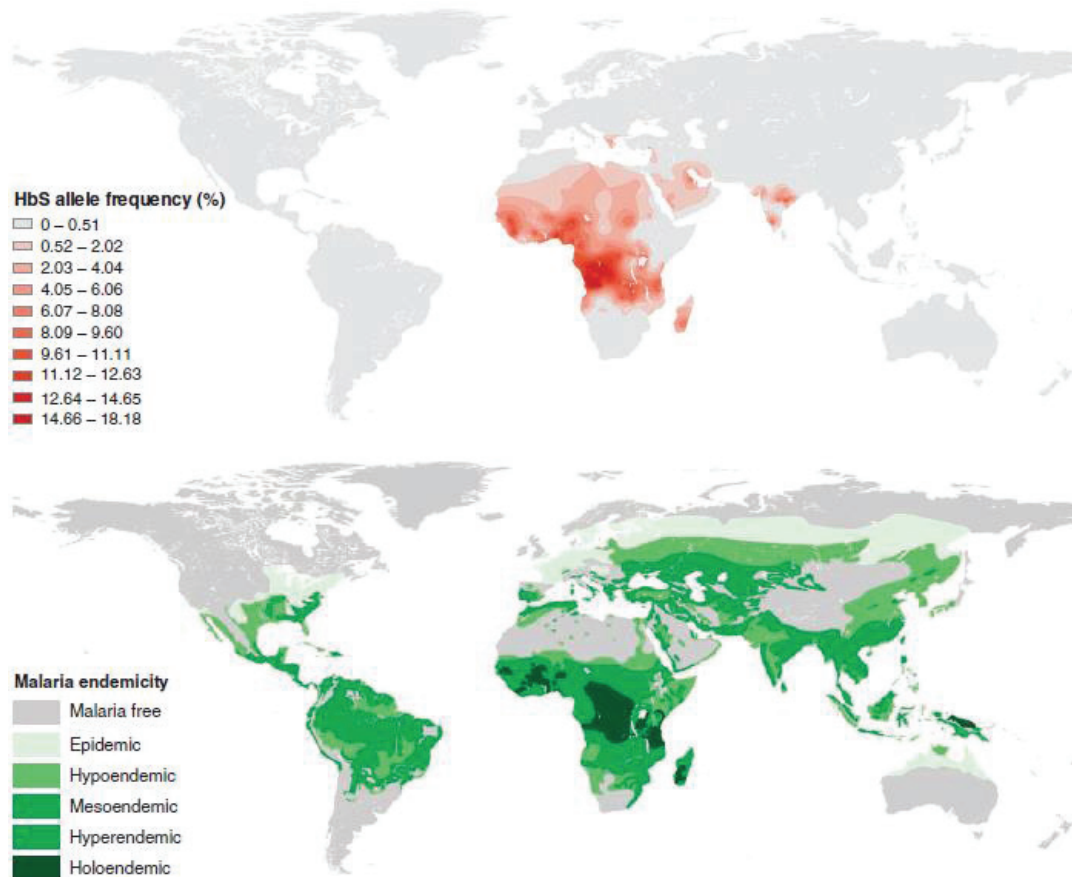


Figure 6. Distribution globale du gène de l'hémoglobine S.

En rouge, la fréquence de l'allèle HbS; en vert, la distribution de paludisme. Extrait de (Piel et al., 2010).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'en Afrique entre 50 et 80% des enfants drépanocytaires homozygotes nés chaque année meurent avant l'âge de 5 ans dû au manque de personnels spécialisés et d'infrastructures adaptées.

En revanche, dans les pays développés, l'espérance de vie des patients drépanocytaires homozygotes ne cesse d'augmenter, passant d'environ 14 ans au début des années 70, à moins de 50 ans dans les années 90 (Platt et al., 1994) et

atteignant environ 60 ans de nos jours (Elmariah et al., 2014) grâce à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués et à la mise au point de traitements visant à limiter la sévérité de la maladie.

B. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DRÉPANOCYTOSE

1. Polymérisation/falcification

Le phénomène de falcification des GRs, caractéristique de la drépanocytose, s'amorce par la polymérisation de l'HbS à l'état désoxygéné (Figure 7). Dans des conditions de faible pression partielle en dioxygène (PO_2), les unités tétramériques d'HbS interagissent et s'organisent en polymères rigides faisant perdre au GR une propriété essentielle, sa déformabilité. La concentration intra-érythrocytaire en HbS et le taux de saturation en O_2 de l'hémoglobine constituent deux paramètres déterminants de la falcification et sont dépendants des fluctuations des milieux intérieur et extérieur.

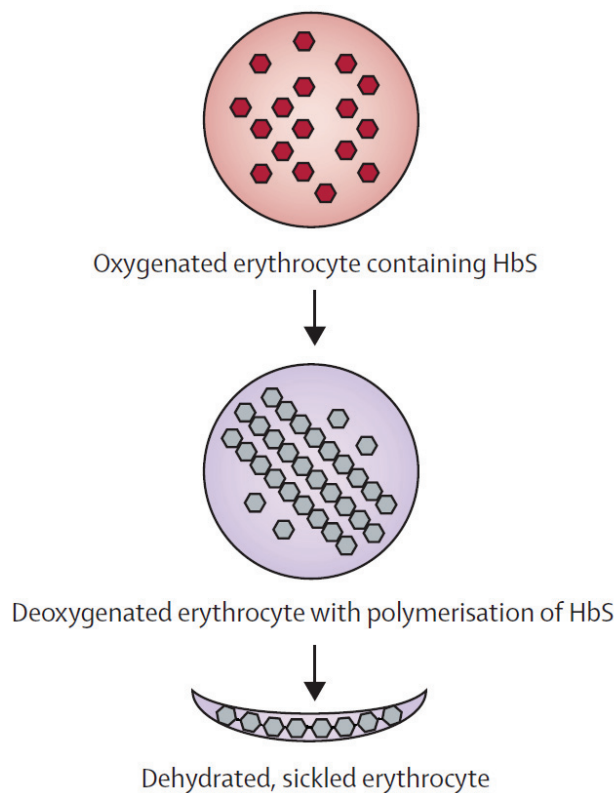


Figure 7. Formation d'un drépanocyte consécutive à la polymérisation de l'HbS en conditions désoxygénées.

En conditions désoxygénées, les molécules d'hémoglobine S forment des liaisons qui modifient l'aspect morphologique du globule rouge. Extrait et modifié de (Rees et al., 2010).

a. Concentration intra-érythrocytaire en Hémoglobine S

La polymérisation de l'HbS est fortement dépendante de la concentration intra-érythrocytaire en HbS. Plus le GR est riche en tétramères d'HbS plus la probabilité qu'ils interagissent entre eux est grande et donc plus la polymérisation est rapide. Cette concentration intra-érythrocytaire en HbS est elle-même influencée par le degré d'hydratation du GR. Or il a été montré que les GRs des homozygotes S/S avaient une perméabilité pour les cations anormalement élevée conduisant à une fuite d'eau depuis le compartiment intracellulaire (Rees and Gibson, 2012). Au niveau moléculaire, deux canaux ioniques membranaires ont été identifiés comme étant à l'origine de ces pertes en eau chez les drépanocytaires : le canal Gardos et le co-transporteur KCl (ou KCC : KCl Channel ; Figure 8).

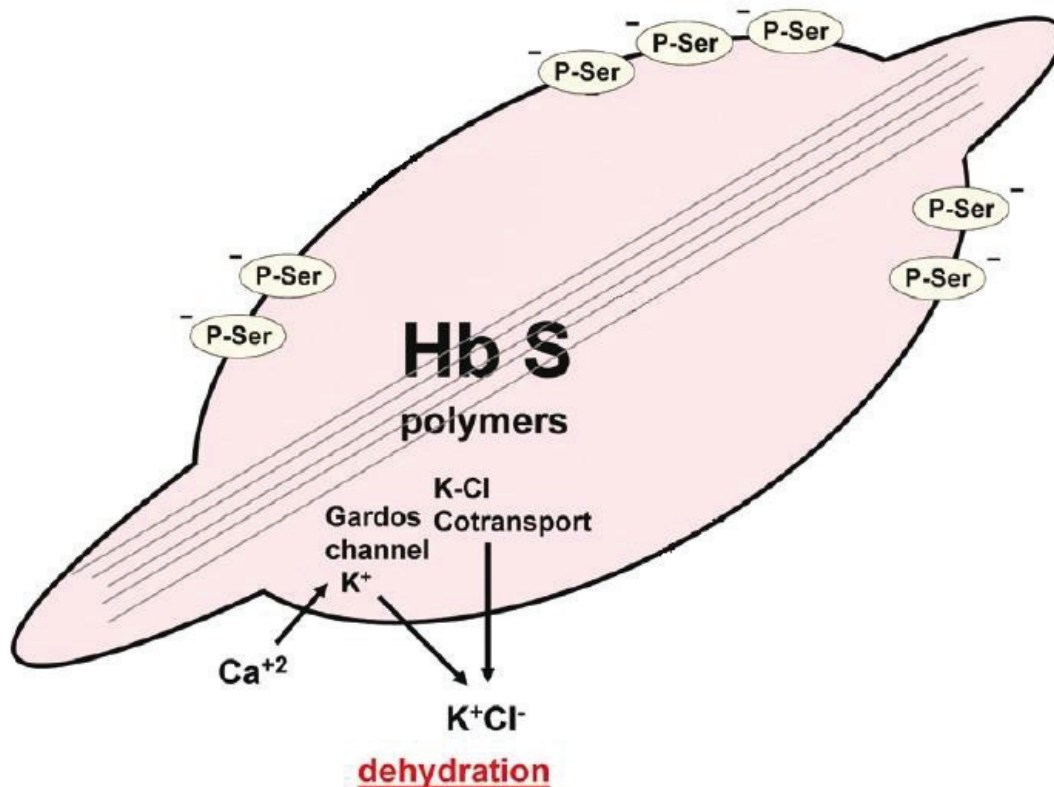


Figure 8. Altérations membranaires d'une cellule falciformée.

Les polymères d'HbS entraînent des changements membranaires délétères via l'externalisation de la phosphatidylsérine (P-Ser). Les canaux ioniques (Gardos et K-Cl) sont également affectés et leur dysfonction entraîne une deshydratation cellulaire. Tiré et modifié de (Odièvre et al., 2011).

- La formation des premiers polymères d'HbS conduit à une perméabilisation de la membrane des GRs ayant pour conséquence une fuite d'ions calcium (Ca^{2+}). Ces derniers alors présents dans le plasma vont aller se fixer en masse sur les **canaux Gardos** Ca^{2+} -dépendants d'autres GRs et provoquer une perte d'ions K^+ accompagnée d'une fuite d'eau vers le compartiment extracellulaire (Bookchin and Lew, 2002).
- La déshydratation ainsi induite par les canaux Gardos s'associe à une acidification du GR qui initie l'ouverture du **co-transporteur KCl**. L'eau et les ions K^+ et Cl^- s'échappant du GR accentuent la déshydratation et donc le risque de falciformation (Bookchin and Lew, 2002).

b. Courbe de dissociation de l'hémoglobine

La relation de saturation en dioxygène de l'hémoglobine en fonction de la pression partielle en dioxygène (PO_2) suit une courbe sigmoïde. Ainsi, plus la PO_2 est faible plus les atomes d'oxygène se détachent de leurs sites de fixation sur l'hémoglobine augmentant la fraction de désoxyhémoglobine dans le sang. Sachant que la polymérisation de l'HbS est grandement facilitée lorsque cette dernière est sous forme désoxygénée, les situations d'hypoxie telles que les séjours en altitude sont généralement déconseillées aux patients homozygotes (Godwin et al., 1981; Willen et al., 2014). Au niveau de l'organisme, la conséquence directe de l'hypoxie est une augmentation de la pression partielle en dioxyde de carbone (PCO_2) associée à une diminution du pH décalant la courbe de dissociation de l'hémoglobine vers la droite (Figure 9), phénomène appelé « Effet Bohr » (Macdonald, 1977). La privation en O_2 favorise également les processus anaérobies glycolytiques au sein du GR et donc la formation intra-érythrocytaire de 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG) (Macdonald, 1977). Ce métabolite direct de la glycolyse régule de façon allostérique la fixation des atomes d'oxygène sur l'hémoglobine entraînant leur libération et donc un glissement de la courbe de dissociation de l'hémoglobine vers la droite (Benesch and Benesch, 1967). De la même façon, une élévation de la température ambiante (et donc corporelle) conduit à une libération des atomes d'oxygène via la dégradation des

liaisons O₂-Hb (Barcroft and King, 1909). La chaleur augmente le métabolisme basal et donc les besoins tissulaires en O₂ justifiant une désaturation plus efficace de l'hémoglobine. Ainsi, chez des sujets sains, ces processus d'acclimatation ont pour but de maintenir un apport adéquat en O₂ aux tissus malgré les fluctuations de l'environnement. Cependant chez les drépanocytaires, la combinaison de ces mécanismes compensatoires avec l'hypoxémie déjà présente (causée par l'anémie hémolytique chronique) s'avèrent délétères car ils contribuent à la forte désaturation en O₂ de l'HbS et par conséquent à sa polymérisation (Pianosi et al., 1993).

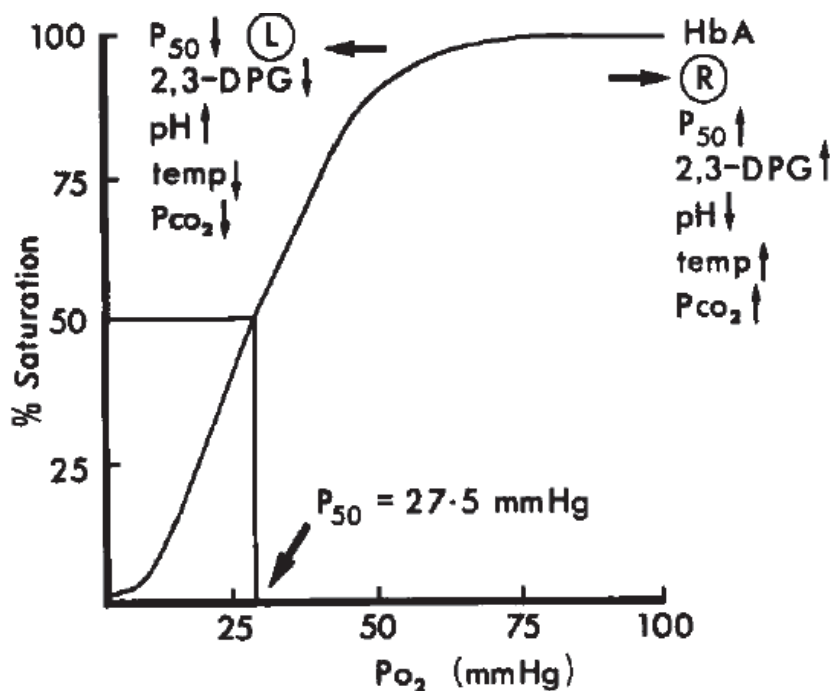


Figure 9. Facteurs contrôlant le déplacement de la courbe de dissociation de l'hémoglobine.

La relation hémoglobine-oxygène n'est pas linéaire mais a un aspect sigmoïde. Chez des sujets sains et en conditions normales de pression et de température, la pression artérielle en O₂ est supérieure à 75mmHg, l'hémoglobine est donc presque saturée à 100%. **P₅₀**: valeur de pression partielle en oxygène pour laquelle l'hémoglobine est saturée à 50% ; **2,3-DPG** : 2,3-Diphosphoglycérate ; **temp** : température ; **PCO₂** : pression partielle en CO₂ ; **L** (left): déplacement de la courbe vers la gauche ; **R** (Right) : déplacement de la courbe vers la droite. Tiré de (Macdonald, 1977).

c. Réversibilité

La polymérisation de l'HbS est cependant un phénomène réversible dans le cas d'un retour à des conditions d'oxygénation suffisantes. Les tétramères d'HbS se détachent donc les uns des autres et le GR reprend sa forme originale biconcave.

Néanmoins, des cycles répétés d'oxygénation/désoxygénation risquent de conduire à la formation de drépanocytes « irréversibles » lorsque les dommages membranaires causés par ces cycles successifs deviennent irréparables. Et, malgré un pouvoir adhésif réduit de ces drépanocytes « irréversibles », dû à une surface de contact avec l'endothélium limitée (Barabino et al., 2010), le risque que ces GRs denses et non-déformables entraînent une occlusion vasculaire est considérablement élevé particulièrement dans les capillaires les plus étroits où la concentration en réticulocytes fortement adhérents est accrue (Manwani and Frenette, 2013).

d. Phénomène compensatoire chez les patients S/S : la production de carboxyhémoglobine

En conditions basales, les S/S affichent une concentration en carboxyhémoglobine (COHb) élevée (Caboot et al., 2012). Cette forme d'hémoglobine a pour particularité de transporter le monoxyde de carbone (CO) trouvé à l'état de traces dans l'air inspiré ou bien issu de la dégradation cellulaire de l'hème par l'Hème Oxygénase-1 (HO-1). Dans le cas de la drépanocytose, l'hémolyse chronique entraîne donc une forte libération de CO qui, en se fixant à l'hémoglobine, augmente l'affinité de celle-ci pour l'O₂ sur les autres sites de liaison (Sears et al., 2001). Le résultat direct est un déplacement de la courbe de dissociation de l'hémoglobine vers la gauche limitant la formation de désoxyhémoglobine et donc le risque de falciformation des GRs. Ce phénomène compensatoire serait donc protecteur pour les patients S/S si bien que cette molécule fait partie des agents thérapeutiques potentiels actuellement testés. En 2013, Belcher et collaborateurs injectent de la MP₄CO, une solution d'hémoglobine humaine saturée en CO conjuguée au polyéthylène glycol pour augmenter sa solubilité, à des souris drépanocytaires NY1DD et Townes. Dans cette large étude, les auteurs montrent les propriétés antioxydantes (stimulation de la translocation nucléaire de Nrf2 et de l'activité hépatique d'HO-1), anti-inflammatoires (inhibition de NF-κB) et antiadhésives (diminution de la stase intravasculaire après un stress d'hypoxie/réoxygénation) de la MP₄CO chez les souris traitées (Belcher et al., 2013b). La même année, Howard *et al.* publient des résultats encourageants d'un

essai clinique de phase I permettant le passage de l'agent thérapeutique en phase II (Howard et al., 2013).

2. Anémie hémolytique

Par définition, l'anémie est une diminution anormale de la concentration sanguine en hémoglobine. Elle est dite hémolytique lorsque ce manque en hémoglobine est dû à une destruction des GRs (hémolyse). Chez les homozygotes S/S, une anomalie de l'organisation de la bicouche lipidique membranaire semble être liée à la destruction des GRs (Stuart and Nagel, 2004). Au niveau de la membrane plasmique des drépanocytes, la forte concentration en ions Ca^{2+} présents au niveau des canaux Gardos (décrit précédemment) active la scramblase Ca^{2+} -dépendante qui transporte activement la phosphatidylsérine de la face interne vers le feuillet membranaire externe (Figure 8) (Lubin et al., 1981). Or une telle redistribution de la bicouche phospholipidique correspond à un signal de reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes (Wu et al., 2006a), favorisant la lyse prématurée des drépanocytes. En parallèle, un agencement défectueux des protéines du cytosquelette, notamment du réseau fibrillaire spectrine/actine, aurait pour conséquence de figer les GRs dans la conformation falciforme, les rendant rigides et donc plus sensibles à l'hémolyse mécanique (Lux et al., 1976). Les S/S ont donc des GRs ayant une durée de vie très courte comparée aux sujets sains, puisque leur survie moyenne est de 15-17 jours contre 120 pour des GRs normaux (Hebbel, 2011). En 1955, Crosby estime que chez les drépanocytaires, un tiers de l'hémolyse survient à l'intérieur des vaisseaux sanguins et deux tiers dans le compartiment intracellulaire (principalement la rate et le foie) (Crosby, 1955).

a. Hémolyse extravasculaire

L'hémolyse extravasculaire est un mécanisme naturel d'élimination des GRs sénescents ou défectueux, assuré par les macrophages et monocytes du système réticulo-endothélial au niveau des tissus (Dhaliwal et al., 2004). Les GRs normaux sont filtrés par les capillaires fenestrés de la rate et du foie grâce aux macrophages

présents à leur voisinage. Comme décrit précédemment les phosphatidylsérines, exprimées en grand nombre sur la membrane des drépanocytes, sont facilement reconnues par les épitopes des phagocytes (Poyart and Wajcman, 1996). Les cellules falciformes sont alors piégées en masse au niveau des sinus hépatiques et spléniques engendrant des obstructions multiples voire des infarctus localisés (Wood et al., 2008). Dans la rate, la conséquence ultime de l'hémolyse extravasculaire est une atrophie splénique généralement visible à partir l'âge de 6-8 ans (Pearson et al., 1969).

b. Hémolyse intravasculaire

L'hémolyse intravasculaire correspond à la lyse des GRs à l'intérieur du compartiment vasculaire. L'intégralité du contenu érythrocytaire est alors relarguée dans le plasma et est susceptible d'entraîner des perturbations du milieu environnant (Figure 10). Dans le plasma, l'oxyhémoglobine interagit avec l'oxyde nitrique (NO) et forme de la méthémoglobine et du nitrate (NO_3^-) entraînant la diminution de la biodisponibilité en NO (Wood et al., 2008). La méthémoglobine porte également des ions fer à l'état ferrique Fe^{3+} ayant un fort pouvoir oxydant. Pour faire face à cela, l'organisme met en place des mécanismes de protection visant à piéger l'hémoglobine ainsi libérée. Le premier mécanisme implique l'**haptoglobine** plasmatique qui fixe rapidement l'hémoglobine libre et la métabolise (Tolosano and Altruda, 2002). Lorsque l'hémolyse devient trop importante, les sites de liaison de l'haptoglobine se trouvent saturés et l'hémoglobine non liée va se dissocier en unités de globine et d'hème. C'est alors que l'**hémopexine**, ayant une forte affinité pour l'hème, capte cette dernière et la dégrade (Tolosano and Altruda, 2002). Ces deux protéines peuvent être utilisées comme biomarqueurs indirects reflétant le degré d'hémolyse. Cependant, la mesure de ces deux protéines ne semble pas être le meilleur indicateur de l'hémolyse à cause du manque de sensibilité des techniques existantes à ce jour (Damanhoury et al., 2015), d'où l'importance de prendre en compte d'autres marqueurs. Bien que la méthode la plus fiable soit la mesure directe de la **survie des GRs** grâce à un marquage avec la biotine ou bien l'isotope radioactif

Chromium 51, elle est peu utilisée en routine pour des raisons pratiques (Rees and Gibson, 2012). Les cliniciens se basent surtout sur l'analyse de la Numération Formule Sanguine (NFS), du taux de réticulocytes et de la concentration en lactate déshydrogénase (LDH) pour estimer indirectement l'hémolyse. L'**hématocrite**, la **concentration en hémoglobine globulaire** et en **GRs** mesurés par simple prélèvement veineux sont des premiers indicateurs d'hémolyse bien que d'autres facteurs physiologiques puissent influencer sur ces marqueurs. Auxquels s'ajoute la **numération des réticulocytes** documentée pour être un paramètre solidement corrélé à la survie des GRs malgré qu'il dépende de l'efficacité de la moelle osseuse à générer ces GRs immatures (Hebbel, 2011). Comme la **LDH** présente en forte concentration est déversée dans le plasma après la lyse des GRs, elle constitue un marqueur relativement fiable d'autant plus lorsque le degré d'hémolyse est élevé (Hebbel, 2011).

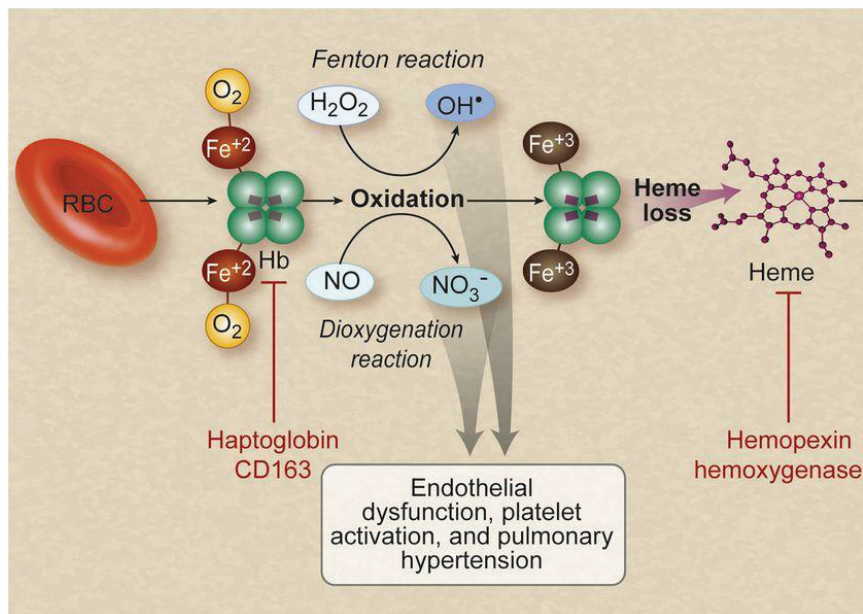


Figure 10. L'hémolyse entraîne la libération du contenu érythrocytaire dans la circulation qui participe à la pathogenèse de la drépanocytose.

L'hémolyse aboutit à la libération d'hémoglobine qui est normalement prise en charge par l'haptoglobine et le CD163. Si l'hémolyse est trop importante, l'hémoglobine libre piège le NO via une réaction de dioxygénation. Elle réagit également avec le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ pour générer le radical hydroxyle OH via la réaction de Fenton conduisant à une dysfonction endothéliale et un remodelage vasculaire pathologique. L'hémoglobine oxydée libère son hème qui est généralement neutralisé par l'hémopexine et est dégradé par l'hème oxygénase-1. **Fe²⁺**: ion ferreux; **Fe³⁺**: ion ferrique; **H₂O₂**: peroxyde d'hydrogène; **OH•**: radical hydroxyle; **NO**: oxyde nitrique; **NO₃⁻**: ion nitrate. Extrait de (Gladwin and Ofori-Acquah, 2014).

Finalement, l'hémolyse (intra- ou extravasculaire) a pour conséquences de limiter la biodisponibilité du NO promouvant vasoconstriction locale, stress oxydant, activation endothéliale et agrégation plaquettaire (mécanismes décrits dans II). Autant de dérèglements qui s'imbriquent dans un cercle vicieux et potentialisent la survenue de crises vaso-occlusives (Chirico and Pialoux, 2012; Hebbel et al., 2004).

3. Crises Vaso-Occlusives

Les crises douloureuses représentent la première cause d'hospitalisation chez les patients drépanocytaires. La première hypothèse formulée pour expliquer la physiopathologie de la crise vaso-occlusive (CVO) était l'obstruction physique des microvaisseaux par les cellules falciformes. Or le temps de transit des GRs dans la microcirculation est généralement plus court que le délai nécessaire à la polymérisation de l'HbS (Eaton and Hofrichter, 1990) suggérant l'intervention d'autres facteurs initiateurs des CVOs. Parmi ces facteurs, on peut citer (1) l'altération des propriétés hémorhéologiques influant sur la déformabilité des GRs et sur la viscosité sanguine, et (2) l'activation endothéliale promouvant les interactions entre l'endothélium et les cellules sanguines (érythrocytes et leucocytes) ainsi que des cellules sanguines entre elles (Figure 11). La conséquence directe est une diminution du flux sanguin du fait de la réduction de la lumière vasculaire pouvant conduire à une obstruction complète du microvaisseau (Frenette, 2002). Les phases d'ischémie/reperfusion subséquentes aux CVO répétées sont à l'origine d'un stress oxydant accru et d'une réponse inflammatoire secondaires aux dommages ischémiques tissulaires. Des médiateurs de l'inflammation tels que la bradykinine, l'histamine et les prostaglandines sont alors libérés sur le site infarci activant la voie de la nociception responsable de la sensation douloureuse (Ballas and Mohandas, 1996).

a. Altérations hémorhéologiques

Les GRs des patients drépanocytaires sont caractérisés par une moindre déformabilité. Cette dernière est due à la déshydratation cellulaire des GRs oxygénés (cf. I.B.1.a) et à la plus forte viscosité cytoplasmique qui en découle. La désoxygénation amenuise la déformabilité déjà compromise des GRs ainsi que leur capacité à se déplacer dans la microcirculation. Le temps de transit est alors allongé et le risque d'occlusion vasculaire s'accroît (Ballas and Mohandas, 1996). La viscosité sanguine est directement liée à la déformabilité et constitue un second facteur influant sur l'occurrence des CVOs. Les patients S/S ont une concentration plasmatique totale en protéines supérieure qui augmente légèrement la viscosité plasmatique par rapport à des sujets sains. Pourtant, malgré une déformabilité altérée et une viscosité plasmatique élevée, la viscosité sanguine des patients S/S est généralement inférieure à celle des sujets sains du fait d'un hématokrite plus faible. A l'inverse, certains patients présentant une hémolyse modérée avec un hématokrite plus élevé et donc une viscosité sanguine plus importante présentent des épisodes vaso-occlusifs plus sévères et plus fréquents (Platt et al., 1991).

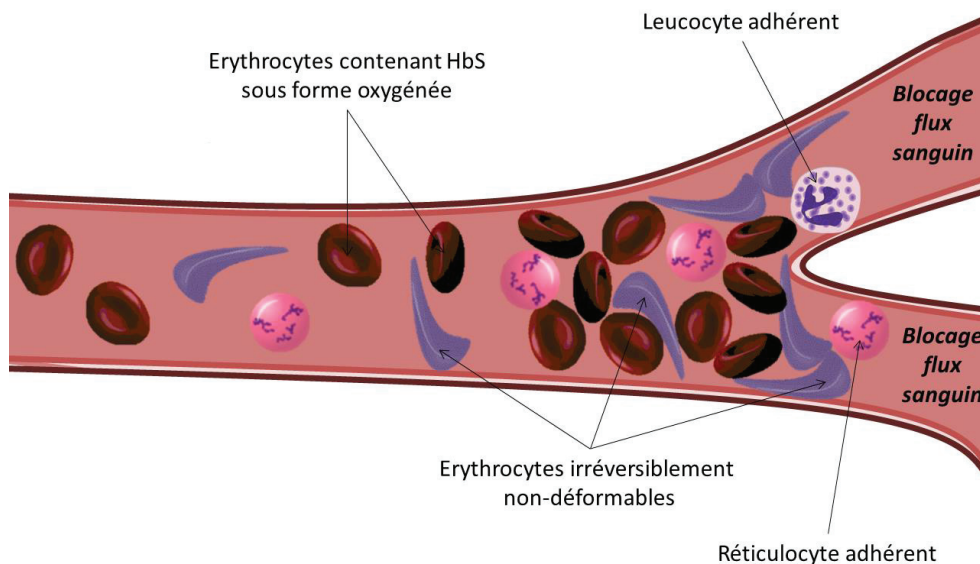


Figure 11. Modélisation d'une crise vaso-occlusive.

Adhérence préférentielle des cellules peu denses (leucocytes et réticulocytes) et piégeage des drépanocytes denses irrésiblement. Ces deux phénomènes concomitants peuvent conduire au final à l'obstruction du vaisseau et au déclenchement d'une crise extrêmement douloureuse pour le patient selon sa localisation.

b. Altérations endothéliales

Dans les années 80, Hebbel *et al.*, ont montré *in vitro* que les GRs S/S étaient capables d'adhérer à l'endothélium activé contrairement aux GRs normaux (Hebbel et al., 1980a). Ils ont ensuite observé une forte corrélation entre le degré de sévérité de la maladie et l'adhérence des GRs S/S (Hebbel et al., 1980b). Des études ultérieures révèlent que les réticulocytes et les GRs de faible densité sont, en général, plus adhérents que les drépanocytes irréversibles de forte densité (Barabino et al., 1987). En 1989, Kaul *et al.* proposent une explication chronologique de la formation d'une vaso-occlusion en deux étapes (Kaul et al., 1989). Dans un premier temps, les réticulocytes, non adhérents chez les personnes saines, sont, chez les patients S/S, pourvus d'un pouvoir adhésif plus important, car ils expriment à leur surface l'intégrine VLA-4, ligand de VCAM-1 au niveau endothélial (Gee and Platt, 1995). Les prémices de la CVO se feraient donc à cause d'une diminution de la lumière vasculaire suite à l'adhésion de ces jeunes GRs déformables à l'endothélium. Cette interaction se trouve être problématique dans les régions où le débit sanguin est déjà modérément faible, c'est-à-dire au niveau des veinules post-capillaires dans la mesure où le risque de désoxygénation/ falciformation des GRs est particulièrement important dans ces zones (Kaul et al., 1989). Plus récemment, la même équipe démontre l'intervention des leucocytes dans le modèle de genèse des vaso-occlusions (Kaul and Fabry, 2004) (Figure 12). Des études en microscopie intravitale sur des souris drépanocytaires transgéniques ont montré que des épisodes d'occlusions transitoires (déclenchés par des hypoxies/réoxygénations) augmentent les interactions entre les leucocytes et l'endothélium par rapport à des souris saines (Kalambur et al., 2004). Une répétition de ces interactions a pour conséquence une diminution du flux sanguin avec une augmentation concomitante du temps de transit des GRs dans les veinules ce qui accentue le risque de polymérisation des GRs. Les cellules falciformes denses ainsi formées se trouvent piégées et engendrent une obstruction transitoire ou prolongée des microvaisseaux (Frenette, 2002).

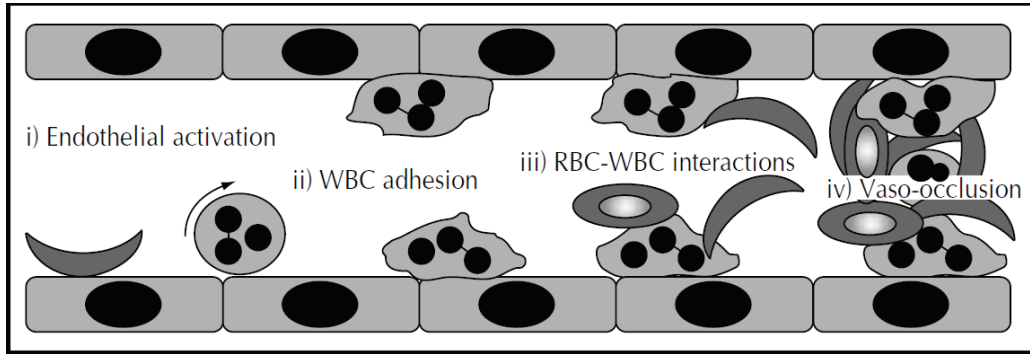


Figure 12. Modèle séquentiel de déclenchement d'une crise vaso-occlusive proposé par Frenette.

L'inflammation chronique active l'endothélium qui exprime alors en masse des molécules d'adhérence vasculaire (i). Les leucocytes interagissent aisément avec ces molécules endothéliales (ii). Ils deviennent activés à leur tour et accrochent les globules rouges circulants (iii). Le ralentissement progressif du flux sanguin causé par la diminution de la lumière du vaisseau entraîne l'obstruction complète du vaisseau (iv). Extrait de (**Frenette, 2002**).

4. Infections bactériennes

Les patients drépanocytaires, et plus particulièrement les enfants, ont un risque élevé de développer des infections bactériennes. Les infections à pneumocoques (*Streptococcus pneumoniae*) et à *Haemophilus influenzae* responsables de pneumonies et méningites bactériennes sont fréquemment observées chez les enfants S/S de moins de 5 ans (Pearson, 1977). La principale explication de cette susceptibilité accrue aux infections est l'altération de la fonction splénique. En effet, la plupart des enfants drépanocytaires présentent une splénomégalie qui disparaît avec l'âge suite aux multiples épisodes vaso-occlusifs et infarctus spléniques. Pourtant le rôle de la rate dans la lutte contre les infections bactériennes est important et double puisqu'elle permet la fabrication d'anticorps spécifiques et l'élimination des bactéries véhiculées par le sang (Pearson, 1977). Une absence ou de faibles concentrations en anticorps sont caractéristiques de la petite enfance mais la dysfonction splénique de la drépanocytose a des effets additifs rendant les enfants drépanocytaires particulièrement vulnérables aux attaques bactériennes. Une carence en certains micronutriments tels que le zinc serait également responsable d'une réponse immunitaire défectueuse (Booth et al., 2010). Une déficience en zinc a été associée à une apoptose exagérée des lymphocytes B et T ainsi qu'à une production réduite

d'interleukine-2, à une activité limitée des cellules NK (« Natural Killer ») et à une dysfonction des cellules Th1 (qui stimulent les cellules phagocytaires).

5. Complications cliniques

Le caractère récurrent et imprévisible des CVOs fait de la drépanocytose une maladie complexe et multi-système, dont l'expression clinique est très variable dans le temps et selon les individus.

a. Complications pulmonaires

Après les crises douloureuses, le syndrome thoracique aigu (STA) est la deuxième cause d'hospitalisation et est responsable de plus de 25% des décès (Vichinsky et al., 1997). Les symptômes du STA semblent être dépendant de l'âge puisque chez les enfants, ils se présentent généralement sous forme de fièvre accompagnée d'une toux sévère alors que chez les adultes ils sont plus souvent caractérisés par une forte douleur thoracique et des difficultés respiratoires mais sont rarement accompagnés de fièvre (Desai and Ataga, 2013). Le diagnostic peut être confirmé par la présence d'infiltrats pulmonaires visibles sur une radio thoracique (Figures 13), une hyperleucocytose¹ et une hyperhémolyse² (Vichinsky et al., 1997). Cette dernière apparaît comme un facteur associé au risque de mort subite dû au STA. En effet, une étude récente réalisée chez des enfants, montre l'existence d'un fort polymorphisme du promoteur du gène de l'hème oxygénase-1 (HO-1), l'enzyme de dégradation de l'hème libérée suite à l'hémolyse (Bean et al., 2012). Les individus avec un faible nombre de répétitions du motif (GT)_n localisé dans le promoteur du gène d'HO-1 ont une enzyme plus active et plus fortement inductible qui serait associé à un plus faible nombre d'hospitalisations dû au STA. Ce syndrome a plusieurs causes possibles telles que les infections dues à divers agents pathogènes (chlamydias, mycoplasmes, parvovirus, légionnelles...) et l'embolie graisseuse secondaire à une nécrose de la moelle osseuse qui libère en masse des acides gras

¹ Augmentation du nombre de globules blancs dans le sang (chez l'Homme lorsque >10 000 GB/ μ L).

² Baisse significative de la concentration en hémoglobine basale

libres obstruant les microvaisseaux pulmonaires (Platt, 2000a). Malgré tout, l'étiologie du STA demeure encore à étudier puisque le facteur déclencheur de près de 50% des STA diagnostiqués reste inconnu (Vichinsky et al., 2000). Cependant, la mise au point récente d'un modèle d'étude fidèle du STA par injection d'hémine chez des souris Townes (Ghosh et al., 2013) devrait permettre des avancées dans l'étude de cette condition particulièrement délétère chez les patients drépanocytaires.

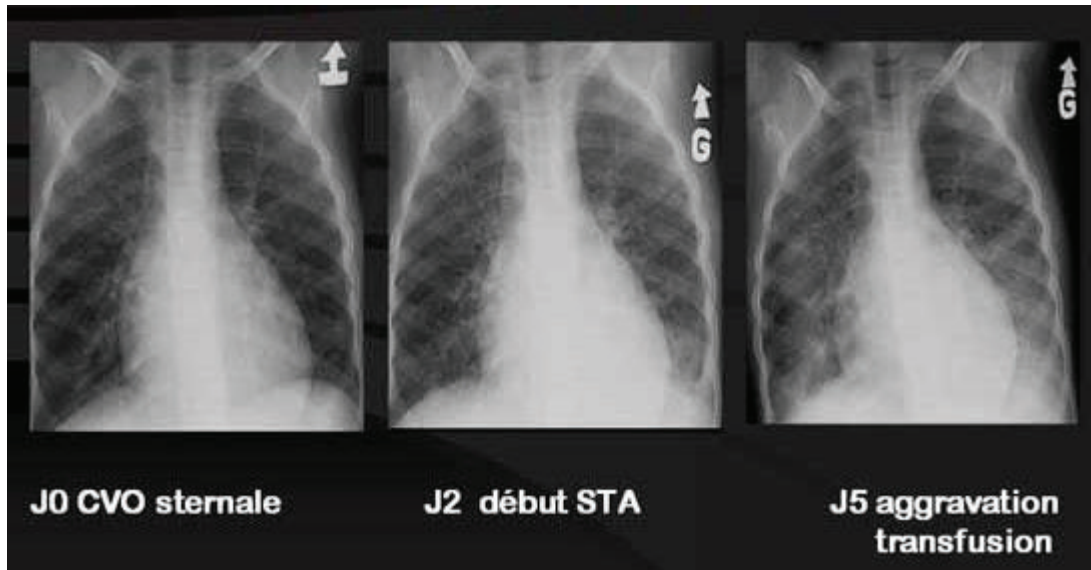


Figure 13. Exemple de clichés radiographiques montrant l'évolution d'un syndrome thoracique aigu (STA).

Tiré de (Bernaudin, 2006). <http://drepanosite.free.fr/drepanocytose.htm>

b. Complications spléniques

La rate est le premier organe subissant des dommages dans la drépanocytose. On observe généralement une splénomégalie chez les très jeunes enfants due à une congestion et des hémorragies multiples (Figure 14). Puis, les occlusions et infarctus spléniques répétés conduisent à une fibrose et à une atrophie progressive (=autosplénoctomie) de cet organe généralement complète vers l'âge de 5 ans (Brousse et al., 2014). L'asplénie³ serait responsable de la forte susceptibilité aux infections (cf. I.B.4.) et augmenterait également le risque de développer une hypertension pulmonaire thromboembolique chronique (Kato et al., 2007), complication associée à un fort taux de mortalité (Gladwin et al., 2004). Les

³ Absence de fonction splénique.

mécanismes sous-jacents sont mal compris mais l'hypothèse principale avancée est qu'à cause de la perte de la fonction de filtrage de la rate, les érythrocytes anormaux resteraient plus longtemps dans la circulation systémique déclenchant l'activation plaquettaire et donc la formation de micro-thrombi dans les poumons (Hoeper et al., 1999).

c. Complications cardiovasculaires

L'anémie chronique caractéristique de la drépanocytose entraîne une réduction de la capacité de transport de l'oxygène qui est compensée par une augmentation du débit cardiaque (Tsironi and Aessopos, 2005). Cette dernière est attribuable essentiellement à une augmentation du volume d'éjection systolique secondaire à une dilatation ventriculaire gauche qui se trouve être étroitement lié à la sévérité de l'anémie (Gladwin and Sachdev, 2012). L'expansion cavitaire induit une hypertrophie ventriculaire pour compenser la surcharge volémique chronique dans l'objectif de maintenir des pressions de remplissage normales. Pourtant, une augmentation de la masse ventriculaire gauche serait notamment associée à une dysfonction diastolique (due à une paroi ventriculaire plus épaisse et donc plus rigide) qui, en combinaison avec une hypertension pulmonaire élèverait considérablement le risque de mortalité chez les patients drépanocytaires (Gladwin and Sachdev, 2012). En revanche, la fonction systolique des ventricules droit et gauche n'est pas altérée chez la majorité des patients (Gladwin and Sachdev, 2012; Sachdev et al., 2007; Tsironi and Aessopos, 2005). Malgré le fait que les CVOs entraînent des infarctus dans de multiples organes, les infarctus du myocarde ne sont pas fréquemment rapportés dans le drépanocytose (Mansi and Rosner, 2002). La plupart des études dans lesquelles une angiographie coronarienne a été effectuée chez des patients S/S révèlent des artères coronaires normales (Gladwin and Sachdev, 2012). Cette résistance apparente aux infarctus du myocarde serait due à de plus faibles concentrations sériques en cholestérol et à un moindre risque de formation de plaques d'athérome (dont la rupture est à l'origine de la majorité des infarctus) dans les coronaires de patients drépanocytaires par rapport à des individus sains d'âges

comparables (Mansi and Rosner, 2002). Pourtant, nombreuses sont les études déplorant une sous-estimation du nombre d'infarctus du myocarde chez les S/S due à ses symptômes semblables à ceux d'une CVO (douleur diffuse ou localisée au niveau du thorax) et à une difficulté de diagnostic dans la mesure où l'électrocardiogramme de base anormal des drépanocytaires masque l'éventuel infarctus (Figure 14) (Mansi and Rosner, 2002).

d. Complications rénales

Dans la drépanocytose, les maladies rénales sont responsables de plus de 16% de la mortalité totale faisant du rein, un organe largement endommagé par cette maladie (Figure 14) (Hamideh and Alvarez, 2013). Les manifestations de la vasculopathie rénale évoluent avec l'âge. Ainsi l'hypertrophie rénale, l'hyperfiltration glomérulaire et l'hyposthénurie⁴ peuvent être visibles dès la petite enfance (Nath and Hebbel, 2015). L'anémie hémolytique chronique caractéristique de la drépanocytose a pour conséquence d'augmenter le volume plasmatique qui participerait donc à l'élévation du débit de filtration glomérulaire via l'augmentation du débit cardiaque. Ce phénomène ne serait cependant pas suffisant pour expliquer l'hyperfiltration glomérulaire puisque cette dernière persiste même après des transfusions sanguines répétées (Stadius van Eps et al., 1967). Le mécanisme principal entrant en jeu serait alors une vasodilatation disproportionnée via la surexpression d'HO-1 induite par l'hyper-hémolyse et la libération subséquente de monoxyde de carbone (Nath and Hebbel, 2015), puissant vasodilatateur ainsi que par une forte libération de prostaglandines vasodilatatrices (Sharpe and Thein, 2011). S'ajoute à cela, le risque important de falciformation des GRs dans la zone médullaire rénale du fait d'une faible pression partielle en O₂, favorisant la formation de micro-thrombi et perturbant la fonction normale du système à contre-courant de concentration de l'urine (Cazenave et al., 2014). Une micro-albuminurie voire une protéinurie complète peut être visible dès l'adolescence chez certains drépanocytaires. Elles se définissent

⁴ Défaut de concentration des urines

respectivement par des concentrations en albumine ou en protéines dans l'urine anormalement élevées et sont des indicateurs de la sévérité des dommages rénaux (Alhwiesh, 2014). Ces dernières risquent alors d'évoluer en maladie rénale chronique et insuffisance rénale terminale progressivement avec l'âge. Le pronostic vital des patients est alors très mauvais puisque l'espérance de vie après avoir atteint le stade terminal est d'environ 2-4 ans et ce malgré un traitement par hémodialyse (Powars et al., 1991; Saxena et al., 2004). Ces chiffres augmentent à environ 10 ans chez les patients ayant subi une transplantation rénale (Sharpe and Thein, 2011).

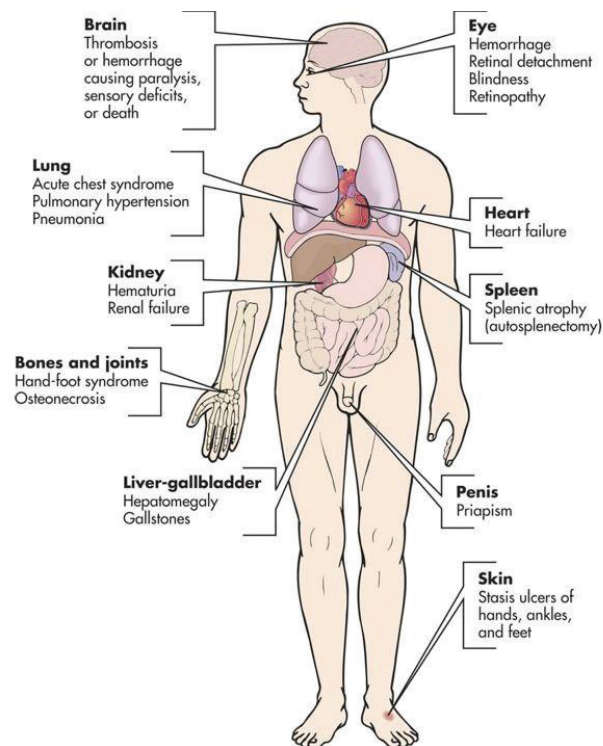


Figure 14. Localisation des différentes manifestations cliniques possibles de la drépanocytose.

Cerveau : thrombose et hémorragie causant paralysie, déficits sensoriels voire mort. **Œil** : hémorragie, décollement rétinien, cécité, rétinopathie. **Poumon** : syndrome thoracique aigu, hypertension pulmonaire, pneumonie. **Cœur** : insuffisance cardiaque. **Rein** : Hématurie, insuffisance rénale. **Rate** : atrophie splénique, autosplénectomie. **Os et articulations** : syndrome pied-main, ostéonécrose. **Foie-vésicule biliaire** : hépatomégalie, calculs biliaires. **Pénis** : priapisme. **Peau** : ulcères de mains, jambes et pieds.

e. Complications hépatiques

La cirrhose hépatique est responsable de près d'1/5^{ème} des décès chez les patients S/S (Berry et al., 2007; Ebert et al., 2010). Elle constitue le stade terminal d'une hépatopathie drépanocytaire complexe (Figure 14) avec des manifestations

cliniques aiguës et chroniques variées incluant calculs biliaires, séquestrations hépatiques, hépatites virales et cholestases intra-hépatiques (Gardner et al., 2014). Même en absence de maladie hépatique avérée, les patients S/S ont généralement des taux plasmatiques anormalement élevés de bilirubine, LDH, aspartate transaminase (AST) et alanine transaminase (ALT) liés à l'hémolyse chronique et reflétant une altération de la fonction hépatique (Banerjee et al., 2001). Le syndrome aigu des crises hépatiques se traduit souvent par une douleur localisée dans le quadrant supérieur droit de l'abdomen, une jaunisse, des nausées et une fièvre modérée. Les taux plasmatiques d'AST, ALT et de bilirubine augmentent drastiquement et le foie est hypertrophié et plus souple à la palpation (Ebert et al., 2010). Le caractère chronique de l'hépatopathie drépanocytaire se développerait progressivement avec l'âge et serait la conséquence de micro-occlusions hépatiques répétées cliniquement silencieuses qui entraîneraient une fibrose du foie puis une cirrhose généralement fatale (Ebert et al., 2010). Les transfusions multiples aggraveraient l'hépatopathie à cause de la formation accrue de dépôts de fer dans les macrophages hépatiques et de la forte augmentation du risque de contracter une hépatite (Banerjee et al., 2001).

f. Complications cérébro-vasculaires

La vasculopathie cérébrale est une complication très sérieuse chez les patients drépanocytaires (Figure 14). Un enfant S/S a 300 fois plus de risques de faire un accident vasculaire cérébral (AVC) qu'un enfant sain (Verduzco and Nathan, 2009). Les 10 premières années de la vie d'un drépanocytaire constituerait la période où le risque de faire un AVC ischémique est le plus élevé. Les jeunes adultes sont, plus enclin à développer un AVC hémorragique, puis passés les 30 ans, le risque d'AVC ischémique augmente à nouveau (Connes et al., 2013a). L'AVC ischémique est causé par un arrêt du flux sanguin suite à une thrombose/sténose ou à une embolie et générant des symptômes tels que des déficits neuro-moteurs localisés (e.g. Hémiplégie), maux de tête, difficultés de langage, changement d'humeur/comportement (Gemmete et al., 2013). L'AVC hémorragique, en revanche, serait dû à

la rupture d'un anévrisme à l'origine d'une hémorragie méningée (Strouse et al., 2006). Les symptômes sont semblables à ceux de l'AVC ischémique, c'est-à-dire, maux de tête sévères, déficits neuro-moteurs localisés, rigidité de la nuque, voire coma (Strouse et al., 2006). Malgré tout, le développement d'une vasculopathie cérébrale peut être détecté de manière précoce grâce au doppler transcranien qui permet de mesurer la vitesse du flux sanguin dans les artères intracrâniennes et de détecter une éventuelle anomalie chez les patients à risques (Brousse et al., 2015).

g. Autres complications

De nombreuses autres complications influant sur la qualité de vie sont visibles chez les patients drépanocytaires. Parmi ces manifestations, le priapisme est un trouble de l'érection particulièrement douloureux chez les patients masculins (Figure 14). Il se traduit par une érection prolongée et incontrôlée généralement due à une ischémie du tissu érectile pouvant conduire à une fibrose du corps caverneux et donc à une dysfonction érectile permanente (Anele et al., 2015). Les ulcères de jambes sont également fréquents (Figure 14), potentiellement très douloureux et handicapants pour les patients S/S. Ils se développent généralement dans les zones où le flux sanguin est relativement faible et par conséquent où le risque de vaso-occlusion est élevé. La CVO entraîne un shunt artério-veineux localisé et cause l'ulcération. A cela s'ajoutent une incompetence veineuse, une réponse anormale du système autonome conduisant à une vasoconstriction excessive, à une anémie et à une diminution de la biodisponibilité en NO qui contribuent à l'altération de la fonction endothéliale et à la formation d'ulcères de jambes (Minniti et al., 2010). Dans la drépanocytose, le système osseux subit aussi des dommages (Figure 14). Le plus répandu est l'ostéomyélite secondaire à une infection à *salmonella*, *staphylococcus aureus* ou entérobactérie à gram négative par voie sanguine (Burnett et al., 1998). L'ostéomyélite est plus répandue chez les enfants drépanocytaires que chez les adultes de par leur vulnérabilité exacerbée aux infections et se présente par une mobilité réduite causée par un gonflement et une souplesse des membres affectés (Skaggs et al., 2001). Au niveau rétinien, les CVOs peuvent conduire, au final, à la

cécité même si dans la plupart des cas, elles causent uniquement une réduction de l'acuité visuelle (Figure 14) (Bonanomi and Lavezzo, 2013).

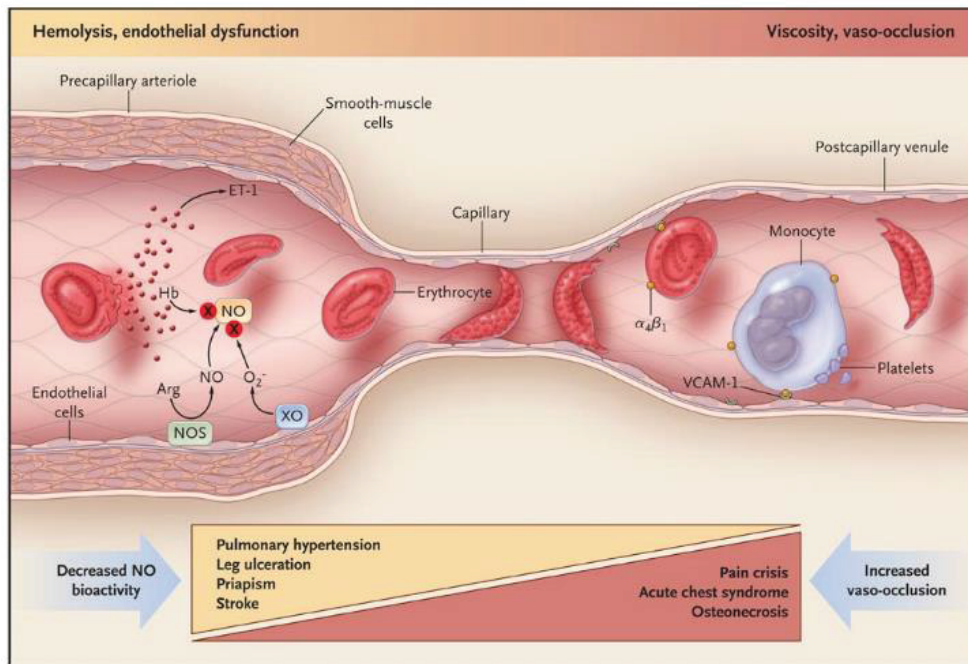


Figure 15. Hypothèse dichotomique des mécanismes à l'origine des manifestations cliniques de la drépanocytose.

L'hypothèse est que les complications de la drépanocytose peuvent être subdivisées en deux sous-phénotypes qui se chevauchent. Les ulcères de jambes, le priapisme, l'hypertension pulmonaire et les AVCs sont associés avec un faible taux d'hémoglobine à l'état stable et une hémolyse intravasculaire exacerbée correspondant à la partie gauche du schéma. Ces complications seraient le résultat d'une dysfonction endothéliale médiée par une inactivation du NO par l'Hb libre et par les ROS vasculaires. Les complications tels que les crises vaso-occlusives, le syndrome thoracique aigu, l'ostéonécrose, la rétinopathie sont associées avec des forts taux de leucocytes et d'hémoglobine à l'état stable. Elles résulteraient d'obstructions capillaires et veineuses par des érythrocytes contenant de l'HbS polymérisée et par des leucocytes adhésifs comme le montre la partie droite de la figure. **ET-1** : Endotheline-1 ; **NOS** : NO synthase ; **O₂⁻** : anion superoxyde ; **XO** : xanthine oxydase ; **VCAM-1** : vascular-cell adhesion molecule-1. Tiré de (Gladwin and Vichinsky, 2008).

h. Dichotomie des sous-phénotypes cliniques de la drépanocytose

La très grande diversité des complications cliniques de la drépanocytose et l'étiologie toute aussi variée de chacune de ces atteintes ont fait émerger l'hypothèse d'un modèle bimodal à l'origine des manifestations cliniques observées dans cette maladie (Figure 15). D'après Kato *et al.*, les sous-phénotypes drépanocytaires peuvent être associés soit à l'anémie hémolytique et à la dysfonction endothéliale sous-jacente soit à un profil visco/vaso-occlusif (Kato et al., 2007). Ainsi, selon ce modèle, les patients présentant une concentration relativement élevée en hémoglobine, une

hyperleucocytose et une faible teneur en HbF développeraient des complications visco/vaso-occlusives tels que les CVOs, STA et ostéonécroses (Morris, 2011). En revanche, les patients ayant une LDH sérique, un taux de réticulocytes et des taux plasmatiques en hémoglobine et arginase élevés serait liés au sous-phénotype hémolytique/dysfonction endothéliale associée à une moindre biodisponibilité en NO avec pour manifestations principales l'hypertension pulmonaire, le priapisme, les ulcères de jambes et potentiellement les AVCs ischémiques (Morris, 2011). Bien évidemment, les deux phénotypes se recoupent et sont étroitement liés mais cette dichotomisation phénotypique pourrait permettre d'orienter et d'optimiser les diagnostics et les traitements possibles chez les patients drépanocytaires (Kato et al., 2007).

C. TRAITEMENTS ACTUELS DE LA DRÉPANOCYTOSE

Depuis les vingt dernières années un certain nombre de thérapies ont vu le jour et ont grandement contribué à l'amélioration des conditions de vie des patients S/S. Cependant, jusque-là, il n'existe encore aucun traitement curatif applicable à l'ensemble de la population drépanocytaire.

1. L'hydroxyurée

L'hydroxyurée est un agent cytotoxique utilisé en chimiothérapie qui a également pour effet d'augmenter la production d'HbF. Elle a été testée pour la première fois en 1984 chez deux patients drépanocytaires (Platt et al., 1984) mais n'a été approuvée par la FDA (US Food and Drug Administration) pour le traitement de cette maladie qu'en 1998 après la publication de résultats concluants d'un essai clinique mené par Charache *et al.* (Charache et al., 1995). Dans cette étude, l'équipe a conduit un essai clinique randomisé en double aveugle sur 299 patients (152 traités à l'hydroxyurée et 147 reçoivent un placebo). Après 21 mois de traitement, le nombre de crises douloureuses a été réduit de moitié chez les patients sous hydroxyurée. Une diminution significative du nombre de patients développant un syndrome thoracique aigu et ceux ayant été transfusés a également été observée. Cette molécule n'est

cependant pas curative et ne présente pas d'effets systématiques sur l'hémolyse, l'inflammation et les dysfonctions endothéliales (Tableau 1). Malgré tout l'hydroxyurée semble augmenter la longévité des patients l'utilisant quotidiennement (Steinberg et al., 2003). De plus, un essai clinique en phase III a récemment montré l'intérêt de l'utilisation de l'hydroxyurée comme traitement préventif alternatif à la transfusion sanguine (qui entraîne une surcharge en fer nocive ; cf. paragraphe suivant) chez des enfants drépanocytaires ayant un fort risque de développer un AVC ischémique (Ware et al., 2016).

Currently available antisickling therapies			
	Chronic transfusion	Hydroxyurea	Hematopoietic stem cell transplantation
Indications	Ischemic CVA Recurrent ACS Splenic sequestration Severe anemia due to renal failure	Recurrent ACS Frequent pain	Ischemic CVA Recurrent ACS Frequent pain Avascular necrosis
Contraindications	Multiple RBC allo-antibodies Poor venous access	Pregnancy	No matched donor
Advantages	Reduce severity of sickle cell complications Prevent stroke in children	Reduce severity of sickle cell complications Improve longevity Increase hemoglobin Gain weight	Curative Prevent further cerebro-vascular disease
Disadvantages	Requires good venous access RBC alloimmunization Iron overload except when using erythrocytapheresis Transfusion-transmitted infection Not curative	Requires monitoring myelosuppression Not curative	Risk of transplant-related death: infection, organ failure, graft versus host disease Risk of chronic graft versus host disease
Beneficial effect on hemolysis	Mild-moderate, depends on sickle RBC fraction. Hemolysis persists	Mild. Hemolysis persists	Curative
Beneficial effect on oxidative stress	Mild. Inflammation persists	Mild? Inflammation persists	Curative

Risks and benefits of each, including their effects on hemolysis and oxidant stress, are presented. Abbreviations: ACS, acute chest syndrome; CVA, cerebral vascular accident; RBC, red blood cell.

Tableau 1. Thérapies actuelles disponibles pour les patients drépanocytaires. Extrait de (Wood et al., 2008).

2. La transfusion sanguine

Le second traitement existant pour prévenir les complications de la drépanocytose est la transfusion sanguine chronique (ou Hypertransfusion ; Tableau 1). Le but est de diminuer la concentration sanguine en HbS en dessous de 30-50%. Ceci a pour effet de corriger l'anémie, de limiter l'érythropoïèse endogène qui entraîne la production d'HbS et donc de réduire la sévérité des complications liées à la maladie en général (Adewoyin and Obieche, 2014). Cependant, le plus gros désavantage de ce traitement est la surcharge en fer que subissent les patients recevant ces transfusions chroniques. Une allo-immunisation érythrocytaire, une

hémolyse persistante et un risque d'infection lié à la transfusion sont également à craindre sur le long terme (Tableau 1). A cela s'ajoute le problème des stocks limités de sang transfusable surtout dans les pays d'Afrique où les patients sont les plus nombreux.

3. La transplantation de cellules souches hématopoïétiques

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques est le seul traitement curatif existant à ce jour (Tableau 1). Le traitement consiste en une première étape de destruction des cellules hématopoïétiques (=myéloablation) du receveur malade suivie d'une étape d'immunosuppression en vue de l'injection des cellules hématopoïétiques saines du donneur compatible (Dalle, 2013). Les érythrocytes néoformés par le patient transplanté ne produisent alors que de l'hémoglobine « saine » HbA. Le risque de rejet est très faible chez les enfants mais augmente considérablement chez les adultes. De plus, ce traitement n'est accessible qu'à une petite catégorie de patients à cause de la difficulté de trouver des donneurs compatibles et du coût élevé de la procédure (Wood et al., 2008).

D. LES MODÈLES MURINS D'ÉTUDES EXPÉRIMENTAUX

L'élaboration de traitements efficaces passe par le développement de modèles animaux permettant la mise au point d'études fondamentales et pharmacologiques visant à tester une thérapie dans un contexte physiopathologique et clinique le plus proche possible de l'Homme.

1. Modèle SAD

C'est en 1990 que les équipes du Dr M. Trudel à Montréal et du Dr Y. Beuzard à Paris mettent au point la souris SAD, un modèle de souris drépanocytaire modifié génétiquement. Un transgène codant pour l' α_2 -globine humaine et la β -globine de synthèse, β^{SAD} ($\beta^{S\text{-Antilles-D-Punjab}}$) a été introduit dans une lignée de cellules germinales

de souris C57Bl/6 (Trudel et al., 1991). Ce transgène a été fusionné avec la LCR⁵ (Locus Control Region) de la β -globine humaine pour augmenter son expression et comporte trois mutations : la mutation β^S Val humaine, la mutation Antilles β^{23} Ile et la mutation D-Punjab β^{121} Gln (Figure 16). Il amplifie la sévérité des manifestations cliniques de la drépanocytose, notamment grâce à la mutation β^{Antilles} . En effet, en 1986, Monplaisir *et al.* (Monplaisir et al., 1986) ont montré que des sujets hétérozygotes A/S, généralement considérés comme asymptomatiques, développaient un syndrome drépanocytaire (crises vaso-occlusives douloureuses, anémie hémolytique modérée, hypertrophie splénique) lorsqu'ils étaient porteurs de la mutation S-Antilles, mutation qui diminuerait la solubilité de l'hémoglobine et son affinité pour l'oxygène. La mutation $\beta^{\text{D-Punjab}}$ participe également à limiter la solubilité de l'hémoglobine en favorisant la formation de sites de contact entre les chaînes de globine, ce qui stabilise le polymère d'hémoglobine formé (Milner et al., 1970).

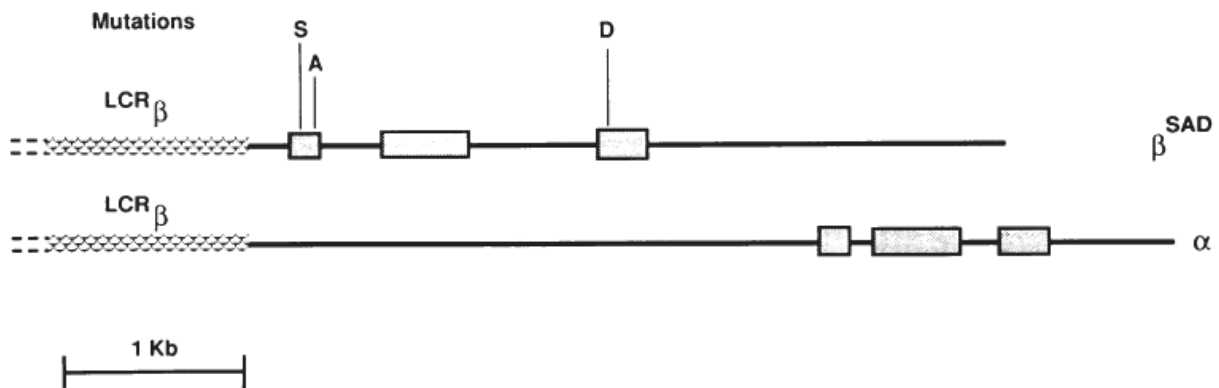


Figure 16. Construction des gènes α - et β -globine utilisés pour générer la souris SAD.

Pour promouvoir une forte expression du transgène, les gènes humains de β -globine SAD et d' α -globine ont été introduits dans une région LCR (Locus Control Region). Les constructions ont ensuite été introduites dans des œufs fertilisés de souris. Extrait de (Trudel et al., 1991).

Les érythrocytes des souris SAD ne contiennent que 19% d'hémoglobine $\alpha_2^{\text{humain}}\beta^{\text{SAD}}$ rendant le phénotype drépanocytaire peu sévère en normoxie. C'est en conditions d'hypoxie que l'hémoglobine SAD polymérise et entraîne la formation de

⁵ Région de contrôle du locus ; séquence d'ADN qui stimule la transcription d'ADN

drépanocytes. Certaines manifestations cliniques de la drépanocytose sont alors visibles chez les souris SAD.

➤ *Reproduction et espérance de vie* : En animalerie, les souris SAD sont générées par le croisement d'un male hétérozygote SAD (les souris homozygotes n'étant pas viables) et d'une femelle C57Bl6/J. Le transgène SAD entraîne une mortalité fœtale/néonatale relativement élevée puisque 32% des nouveau-nés sont identifiés comme étant SAD contre 50% attendus (Trudel et al., 1991). Leur espérance de vie est réduite par rapport à des souris contrôles de fond génétique identique (15 ± 7 mois pour les SAD contre 23 mois pour les C57Bl6/J et 28 mois pour les CBA/J) (Trudel et al., 1994).

➤ *Hématologie* : les souris SAD affichent un faible nombre de drépanocytes irréversibles et une légère augmentation de la densité érythrocytaire. Elles sont anémiques à la naissance probablement du fait de l'absence d'hémoglobine fœtale chez les souris, contrairement aux humains (Tableau 2). En effet, les souris expriment les $\beta 1$ et $\beta 2$ -globines aussi bien pendant l'érythropoïèse hépatique fœtale qu'à l'âge adulte dans la moelle osseuse (McConnell et al., 2011). Chez les souris SAD adultes, l'anémie est ensuite corrigée (Trudel et al., 1994).

➤ *Dommmages spléniques* : La forte séquestration de globules rouges est responsable d'une hypertrophie splénique et de la formation de dépôts hémosidérines (pigment insoluble contenant de l'hydroxyde de fer $\text{Fe}(\text{OH})_3$; forme de stockage du fer ; Tableau 2) (Trudel et al., 1994).

➤ *Dommmages pulmonaires* : Une congestion modérée des capillaires associée à des dépôts hémosidérines alvéolaires sont visibles dans les poumons de souris SAD spontanément mortes ou soumises à un stress d'hypoxie-réoxygénation (Tableau 2). De légers infarctus, hémorragies et thromboses sont également observables après autopsies (Trudel et al., 1994).

➤ *Dommmages rénaux* : Les glomérules rénaux sont sclérosés, congestionnés et riches en dépôts hémosidérines chez environ une souris SAD sur deux (Tableau 2) (Trudel et al., 1994).

	Patients drépanocytaires	Souris SAD H/R	Souris Townes
Anémie	✓ ¹	x ²	✓ ³
Hyperréticulocytose	✓ ¹	x ²	✓ ³
↓ nombre globules rouges	✓ ¹	x ²	✓ ³
↓ concentration hémoglobine	✓ ¹	x ²	✓ ³
↓ hématocrite	✓	x	✓ ³
Polychromatophilie	✓ ¹	x	✓ ³
Anisocytose	✓ ¹	x	✓ ³
Poïkilocytose	✓ ¹	x	✓ ³
Rate			
Hypertrophie	puis atrophie ⁴	✓ ^{2,6}	✓ ³
Congestion	✓ ⁵	✓ ⁶	✓ ^{3,7}
Dépôts hémosidérine	✓ ⁵	✓ ⁶	✓ ^{3,7}
Infarctus	✓ ⁵	x ⁶	✓ ³
Poumon			
Infarctus	✓ ⁸	✓ ⁶	?
Thromboses	✓ ⁸	✓ ⁶	?
Hémorragies	✓ ⁸	✓ ⁶	✓ ¹⁰
Œdèmes	✓ ⁸	x	✓ ^{10,11}
Syndrome Thoracique Aigu	✓ ⁹	x	✓ ^{10,11}
Rein			
Congestion	✓ ¹²	✓ ^{6,13}	✓ ^{3,7}
Glomérulosclérose	✓ ¹²	✓ ⁶	✓ ³
Dépôts hémosidérine	✓ ¹²	✓ ^{6,13}	✓ ^{3,7}
Foie			
Hyperplasie cellules Kupffer	✓ ¹⁴	✓ ⁶	✓ ³
Congestion	✓ ¹⁴	✓ ⁶	✓ ^{3,7}
Dépôts hémosidérine	✓ ¹⁴	✓ ⁶	✓ ^{3,7}
Erythrophagocytose	✓ ¹⁴	✓ ⁶	✓ ³
Infarctus	✓ ¹⁴	x	✓ ³

Tableau 2. Récapitulatif des similitudes et différences entre les caractéristiques des modèles murins et de l'Homme.

¹(Sydenstricker, 1924) ; ²(Trudel et al., 1991) ; ³(Wu et al., 2006b) ; ⁴ (Brousse et al., 2014) ; ⁵(Magid et al., 1984) ; ⁶(Trudel et al., 1994) ; ⁷(Manci et al., 2014) ; ⁸(Haupt et al., 1982) ; ⁹(Vichinsky et al., 1997) ; ¹⁰(Ghosh et al., 2013) ; ¹¹(Ghosh et al., 2012) ; ¹²(Nath and Hebbel, 2015) ; ¹³(De Paepe and Trudel, 1994) ; ¹⁴(Banerjee et al., 2001).

➤ *Dommmages hépatiques* : Une congestion du foie des souris SAD (occurrence = 1/3 (Trudel et al., 1994)) entraîne des dépôts hémosidérines ainsi qu'une forte érythrophagocytose associée à une hyperplasie des macrophages hépatiques (=cellules de Kupffer ; Tableau 2).

Aujourd'hui, le modèle SAD est quelque peu délaissé par les équipes de recherche, de par la relative faible sévérité de la maladie chez ces souris et la forte variabilité phénotypique intra-souche. La souris Townes, un modèle exprimant exclusivement l'hémoglobine humaine avec un phénotype très proche de celui observé chez les patients homozygotes est dorénavant utilisé par de nombreuses équipes (Belcher et al., 2013a; Chantrathammachart et al., 2012; Ghosh et al., 2013; Potoka and Gladwin, 2015; Sparkenbaugh and Pawlinski, 2013).

2. Modèle TOWNES

La souris Townes est un modèle de souris transgéniques issues d'un croisement sur plusieurs générations des souches C57Bl6J et 129S1/SvImJ. Elle exprime exclusivement l'hémoglobine humaine. Son gène d'hémoglobine présente trois mutations type « knock-in » (Figure 17):

- La mutation $Hba^{tm1(HBA)Tow}$ ou $h\alpha$, correspondant à l'inactivation du gène codant pour l' α -globine endogène, remplacé par le gène α humain.
- La mutation $Hbb^{tm2(HBG1,HBB)Tow}$ ou -1400 γ - β^S (indiquant la taille du fragment inséré), construite par l'insertion des gènes γ -globine et β^S -globine remplaçant les gènes β -globine murins.
- La mutation $Hbb^{tm3(HBG1,HBB)Tow}$ ou -383 γ - β^A , conçue par l'inactivation des gènes β -globine murins et l'insertion des gènes γ -globine et β^A -globine humains.

Trois génotypes différents, viables et fertiles, peuvent alors être générés. Toutes les souris sont homozygotes sur le locus $h\alpha$, mais peuvent être soit homozygotes β^A/β^A (phénotype sain) ou β^S/β^S (phénotype drépanocytaire humain) soit hétérozygotes β^A/β^S .

Comme précisé précédemment, l'hémoglobine exprimée par les souris pendant la phase de croissance est la même que celle exprimée à l'âge adulte. La souris Townes a la particularité de synthétiser de l'hémoglobine foétale, dominante en fin de gestation et durant la phase néonatale. Tout comme chez l'Homme, la synthèse

d'HbF diminue ensuite progressivement pour être produite en très faible quantité à l'âge adulte. Ainsi, à partir de la 3^{ème} semaine post-natale la souris Townes n'exprime plus que 0,4% de γ -globine (Figure 18) (McConnell et al., 2011). Elle commence alors à développer les caractéristiques physiopathologiques de la drépanocytose.

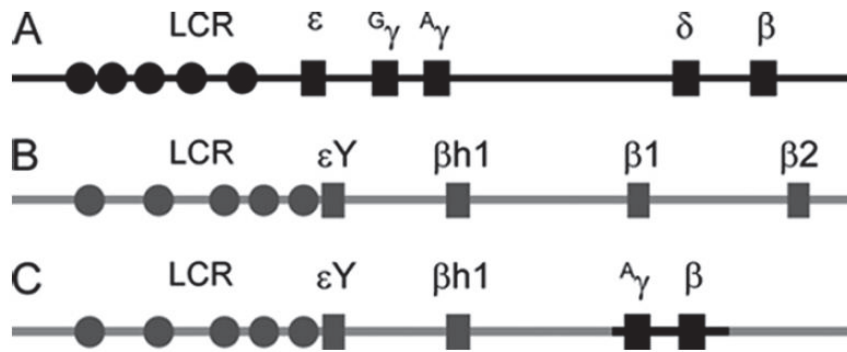


Figure 17. Construction des gènes α -, β - et γ -globines de la souris Townes.

A : Le locus humain de β -globine porte 5 gènes fonctionnels localisés en aval d'une région amplificatrice LCR. **B :** Le locus de β -globine murin a 4 gènes hautement exprimés situés en aval d'une région amplificatrice LCR. **C :** Le locus humanisé de β -globine comporte les gènes α - et β -globine à la place des gènes murins adultes $\beta1$ - et $\beta2$ -globines. Extrait de (McConnell et al., 2011).

➤ *Reproduction et espérance de vie* : Le fournisseur « The Jackson Laboratory » recommande de croiser des femelles A/S avec des males A/S, A/A ou bien S/S ; les femelles S/S n'étant pas préconisées pour la reproduction car trop fragiles. Malgré un phénotype drépanocytaire sévère, les souris Townes peuvent survivre jusqu'à 15 mois (Potoka and Gladwin, 2015).

➤ *Hématologie* : Les souris Townes sont sévèrement anémiques. Effectivement, les concentrations en globules et en hémoglobine des souris S/S sont significativement diminuées par rapport à leurs homologues A/A et A/S (Tableau 2). Auxquelles s'ajoutent, une hyperréticulocytose⁶ associée à une polychromatophilie⁷ et une diminution de l'hématocrite. Poikilocytose⁸ et anisocytose⁹, caractéristiques des

⁶ Augmentation du nombre de réticulocytes circulants

⁷ Caractérise la grande variété de coloration des cellules sanguines s'observant sur un même frottis sanguin

⁸ Définit la grande variabilité de formes des hématies sur un même frottis sanguin

⁹ Définit la grande variabilité de diamètres des hématies sur un même frottis.

patients drépanocytaires homozygotes, sont également observables chez les souris Townes S/S (Wu et al., 2006b).

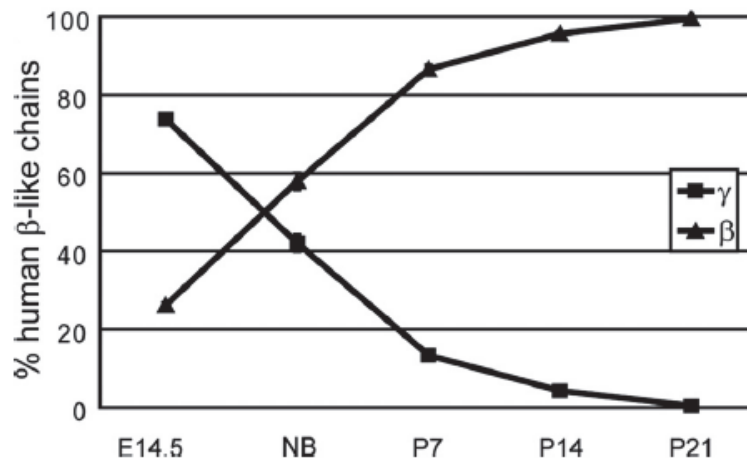


Figure 18. Evolution de la transition des chaînes de globine au cours du développement chez la souris Townes.

La transition de l'hémoglobine fœtale à l'hémoglobine adulte est complète vers la 3^{ème} semaine post-natale chez la souris transgénique Townes. **E14.5**: 14,5^{ème} jour embryonnaire; **NB**: Newborn= jour de naissance; **P7**: 7^{ème} jour post-natal; **P14**: 14^{ème} jour post-natal; **P21**: 21^{ème} jour post-natal. Extrait de (McConnell et al., 2011).

➤ *Dommmages spléniques* : La rate est largement hypertrophiée chez les Townes S/S, son poids moyen étant 7 fois supérieur à celui des A/A et A/S (Tableau 2). Dans cet organe, les signes d'anémie et de vaso-occlusion se manifestent par des dépôts hémossidérines, une congestion et des infarctus localisés (Wu et al., 2006b). La pulpe rouge nettement plus étendue chez les Townes S/S révèle une forte séquestration des GRs et une érythropoïèse élevée.

➤ *Dommmages pulmonaires* : Comme chez les souris SAD, les poumons des souris Townes sont surtout altérés après un stress particulier (Tableau 2). Récemment Ghosh *et al.* (Ghosh et al., 2013), ont mis au point le modèle ALI (=Acute Lung Injury) présentant les caractéristiques du syndrome thoracique aigu (« Acute Chest Syndrome ») via une injection intraveineuse unique d'hémine chez des souris Townes S/S. Ces souris développent rapidement des difficultés respiratoires importantes et meurent dans les 2 heures suivant l'injection. Les autopsies révèlent des poumons congestionnés ainsi que des œdèmes et hémorragies localisées (Ghosh et al., 2013).

➤ *Dommages rénaux* : Des micro-occlusions vasculaires surviennent dans les reins des Townes S/S entraînant congestion et glomérulosclérose (Tableau 2). L'hémolyse importante conduit à la formation de dépôts hémosidérines. Ces altérations rénales perturbent l'osmolalité de l'urine, qui est alors anormalement diluée chez les Townes S/S (Wu et al., 2006b).

➤ *Dommages hépatiques* : Le foie des souris S/S affiche une hyperplasie des macrophages de Kupffer pour éliminer les nombreux déchets membranaires dus à l'hémolyse chronique (Tableau 2). Il en résulte l'agrégation de pigments hémosidérines. Congestion et infarctus multiples sont les conséquences d'épisodes vaso-occlusifs hépatiques récurrents chez ces souris (Wu et al., 2006b).

Comme le montre le tableau 2, ce modèle de souris humanisées présente un large panel de manifestations cliniques similaires à celles observées chez l'Homme.

3. Les autres modèles de souris transgéniques drépanocytaires

La NY1DD (ou $\alpha^H\beta^S[\beta^{MDD}]$) est une souris de fond génétique C57Bl/6 et est homozygote pour la délétion sur le locus du gène de globine murine β^{major} et exprime un transgène de globines α et β^S humaines. En absence de stress particulier, ce modèle n'est pas anémique mais présente une fraction accrue d'HbS ainsi que certaines anomalies hématologiques caractéristiques de la drépanocytose telles qu'une densité érythrocytaire élevée, une forte affinité de l'Hb pour l'oxygène et une hyperréticulocytose (Fabry et al., 1992). Un stress d'hypoxie/réoxygénation engendre une réponse inflammatoire avec adhésion des leucocytes à l'endothélium (Kaul and Hebbel, 2000) et activation du NF- κ B (Osarogiagbon et al., 2000).

La BERK est une souris de fond génétique multiple développée par Pászty *et al.* (Pászty et al., 1997) chez laquelle les gènes de globines murines α et β ont été invalidées et un transgène portant les globines α , β^S , $A\gamma$, $G\gamma$ et β humaines a été inséré. Ces souris expriment quasiment exclusivement l'hémoglobine humaine et présente alors un grand nombre de similarités physiopathologiques avec les patients humains

avec notamment une falciformation érythrocytaire associée à une hémolyse intravasculaire et à une anémie sévère (hématocrite = 10-30%), une inflammation chronique ainsi qu'infarctus, congestion et surcharge en fer dans de multiples organes (Manci et al., 2006).

II. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES PATHOGÉNIQUES DE LA DRÉPANOCYTOSE: INFLAMMATION, STRESS OXYDANT ET BIODISPONIBILITÉ DU NO

A. LA DRÉPANOCYTOSE : UNE MALADIE INFLAMMATOIRE CHRONIQUE

1. L'inflammation et l'adhérence vasculaire

L'inflammation est une réponse adaptative déclenchée par un stimulus douloureux d'alerte à une attaque tissulaire endogène ou exogène (pathogènes divers) et dont la finalité est la guérison du site endommagé (Dziedzic, 2015). Suite à un traumatisme, le flux sanguin, la perméabilité vasculaire, le nombre de leucocytes et la sécrétion de cytokines augmentent localement (Medzhitov, 2008) afin de permettre l'action « réparatrice » des éléments figurés sanguins, en suivant un processus en plusieurs étapes (Figure 19) :

1. Attachement : Les prémices du recrutement leucocytaire sont réalisées grâce à l'interaction entre différentes sélectines ayant pour rôle de freiner la course du leucocyte dans la circulation. A sa surface, le globule blanc exprime la L-sélectine et PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) ; ces sélectines, en interagissant avec la P-sélectine endothéliale, vont maintenir le GB proche de l'endothélium, et permettre ainsi la phase suivante (Ley and Tedder, 1995).

2. Roulement : Une fois ralenti et au contact de l'endothélium, le leucocyte roule le long de ce dernier. Cette phase est médiée par des molécules d'adhérence telles que les sélectines mais aussi par des immunoglobulines, même si l'interaction est moins forte et se fait uniquement à de faibles vitesses de cisaillement (Ley and Tedder, 1995). Diverses interactions se font alors : L-sélectine et PSGL-1 leucocytaires se lient à P-sélectine et E-sélectine endothéliales ; les intégrines $\alpha_4\beta_7$ et $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) interagissent respectivement avec les immunoglobulines MadCAM-1 (Mucosal addressin-cell adhesion molecule-1) et VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) (Granger and Senchenkova, 2010).

3. Adhésion ferme : L'étape suivante du recrutement leucocytaire consiste en un renforcement des liaisons de faible affinité conduisant à un arrêt total du déplacement du leucocyte (Granger and Senchenkova, 2010). Cette adhésion ferme est possible grâce à l'activation leucocytaire et est médiée par de multiples interactions intégrine leucocytaire activée/immunoglobuline endothéliale. En effet, après activation, les intégrines exprimées à la surface des leucocytes telles que $\alpha_4\beta_7$, VLA-4 ou Mac-1 pourront créer des liaisons de forte affinité avec les immunoglobulines MadCAM-1, VCAM-1 et ICAM-1 respectivement.

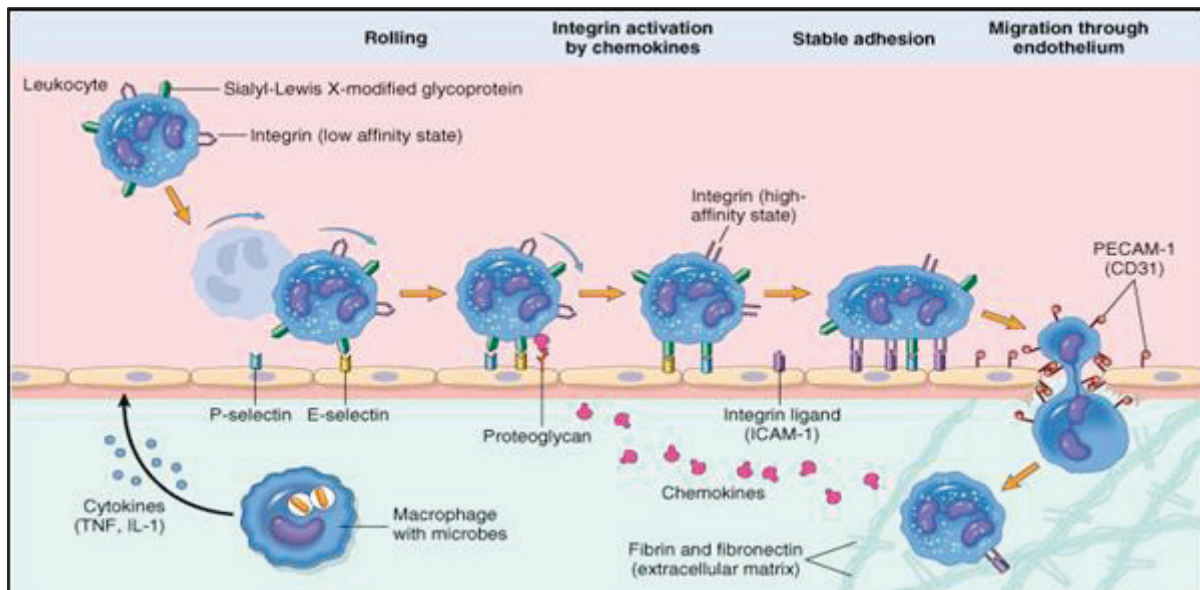


Figure 19. Etapes de l'internalisation d'une cellule inflammatoire dans un tissu.

Le leucocyte ralentit sa course puis « roule » en interagissant avec des molécules d'adhérence, les sélectines, exprimées sur l'endothélium. Il s'attache ensuite fermement à ce dernier grâce à des immunoglobulines et migre enfin à l'intérieur du tissu enflammé. Tiré de (Kumar et al., 2014).

4. Migration transendothéliale (=diapédèse leucocytaire) : Suite à l'adhésion ferme, le leucocyte est capable de migrer à l'intérieur du tissu enflammé en empruntant l'espace existant entre les cellules endothéliales (Muller, 2011). De nombreuses molécules sont impliquées dans ce processus qui se décompose en plusieurs étapes contrôlées par des molécules spécifiques. Par exemple, platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), exprimée à la surface des plaquettes, leucocytes et cellules endothéliales, constitue un acteur indispensable de la diapédèse puisque son blocage spécifique empêche la migration à travers

l'endothélium de 70-90% des monocytes (Muller et al., 1993). PECAM-1 intervient en début de diapédèse, alors que les leucocytes ne se trouvent encore qu'à la surface apicale de la cellule endothéliale (Schenkel et al., 2002). La protéine transmembranaire CD99 joue également un rôle critique dans la diapédèse mais intervient à un stade plus avancé que PECAM-1 lorsque le leucocyte est à l'intérieur de la jonction endothéliale (Schenkel et al., 2002).

Dès que l'agent infectieux est détruit ou bien que le tissu endommagé est réparé, l'inflammation se résorbe progressivement grâce à l'élimination par apoptose des cellules « inflammatoires » activées permettant un retour à la normal du nombre des leucocytes (Maskrey et al., 2011). Ce phénomène de résolution de l'inflammation est un processus actif finement régulé via la sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires endogènes. Toutefois, une accumulation et une activation persistante des leucocytes, sont caractéristiques d'une inflammation chronique et participent à la dysfonction de ces mécanismes de régulation négative (Hanada and Yoshimura, 2002).

2. Les cytokines, médiateurs de l'inflammation

Les cytokines sont de petites protéines synthétisées par la quasi-totalité de cellules nucléées et jouent un rôle essentiel dans la communication intercellulaire. On distingue différentes classes de cytokines dont les interleukines (IL), initialement décrites pour être sécrétées et utilisées par les leucocytes pour communiquer entre eux ; les interférons (IFN), qui ont la capacité d'activer les cellules « Natural Killer » (NK) et les macrophages ; et les facteurs de nécrose tumorale (TNF) impliqués dans les processus de mort cellulaire (Borsini et al., 2015). Parmi ces nombreux médiateurs, IL-1, IL-6 et TNF- α apparaissent comme étant des molécules puissantes, pléiotropiques et primordiales des stades aigu et chronique de l'inflammation (Feghali and Wright, 1997).

➤ *IL-1*: IL-1 α et IL-1 β sont sécrétées par les macrophages/monocytes, lymphocytes T et B, fibroblastes et kératinocytes. La fixation de ces dernières sur leur récepteur IL-1R induit l'expression d'un large spectre de cytokines, chimiokines et de molécules d'adhérence, et ce, notamment sur les cellules endothéliales, conduisant au recrutement leucocytaire décrit précédemment (Kleemann et al., 2008). En parallèle, IL-1 entraîne la production d'histamine par les mastocytes qui permet une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire (Feghali and Wright, 1997). IL-1 déclenche également la fièvre en stimulant la sécrétion de la prostaglandine E₂ (PGE₂), actrice de la sensation douloureuse (Dinarello, 2000). Cette production de prostaglandines est possible notamment grâce à la libération de cyclooxygénase-2 (enzyme de conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine) médiée par le facteur de transcription NF- κ B. L'activation de ce dernier permet aussi la sécrétion d'iNOS (« inducible nitric oxide synthase ») à l'origine de la fonction cytotoxique du macrophage via une surproduction de NO (Hanada and Yoshimura, 2002).

➤ *TNF*: TNF- α et - β sont produits par les macrophages/monocytes activés, fibroblastes, mastocytes, cellules NK et lymphocytes T et sont les ligands de TNF-R1, exprimé à la surface de la plupart des cellules de l'organisme et de TNF-R2, qui lui est essentiellement retrouvé à la surface des cellules hématopoïétiques (Balkwill, 2009; Feghali and Wright, 1997). L'action des TNF est très similaire à celle d'IL-1 : déclenchement de fièvre via PGE₂, activation de la translocation nucléaire de NF- κ B, sécrétion d'une multitude de chimiokines... La particularité des TNF par rapport à IL-1 est qu'ils sont capables d'induire la mort cellulaire programmée. De ce fait, IL-1 et TNF agissent souvent de façon synergique lors des processus inflammatoires (Dinarello, 2000).

➤ *IL-6* : Historiquement, IL-6 a été identifié comme facteur de différenciation des lymphocytes B avec pour fonction majeure, l'induction d'anticorps. Sa production est stimulée par les phagocytes mononucléaires, les lymphocytes et les fibroblastes (Akira et al., 1990). En plus de son action essentielle dans l'immunité humorale, IL-6

joue un rôle dans l'hématopoïèse en stimulant la production de progéniteurs, dans la coagulation en activant la formation de plaquettes et dans la synthèse des protéines hépatiques de phase aigüe (e.g. Protéine C-réactive CRP, haptoglobine, hémopexine) (Akira et al., 1990). Les fonctions d'IL-6 se recoupent et complètent, là encore, celles d'IL-1 et de TNF, et chacune des cytokines régule l'expression des autres. Ainsi, IL-1 et TNF sont des inducteurs potentiels d'IL-6 et IL-6 régule négativement l'expression de TNF (Feghali and Wright, 1997).

Si le stimulus pro-inflammatoire persiste, une inflammation chronique se développe médiée par une production chronique d'IL-1, IL-6 et de TNF par les macrophages (Feghali and Wright, 1997). Cette inflammation chronique est associée à de nombreuses maladies (maladies métaboliques, maladies cardiovasculaires, cancers, maladies auto-immunes,...) (Hotamisligil, 2006; Osiecki, 2004; Shacter and Weitzman, 2002; Weiner HL, 2004) dont la drépanocytose (Platt, 2000b).

3. Drépanocytose, cytokines pro-inflammatoires et molécules d'adhérence

Une des caractéristiques cliniques de la drépanocytose est l'hyperleucocytose qui se manifeste par une élévation anormale et chronique du nombre de monocytes et neutrophiles ainsi que des taux de cytokines et de protéines de phase aigüe (Hoppe, 2014). Chez les patients, ces marqueurs de l'inflammation sont surexprimés de façon chronique à l'état « stable » et seraient pour la plupart d'autant plus élevés en crise (Sparkenbaugh and Pawlinski, 2013; Tableau 3). Malgré de grandes disparités dans les méthodes d'analyse utilisées et dans la population étudiée, de nombreuses études reportent, chez l'adulte à l'état « stable » des concentrations plasmatiques élevées en TNF- α (Bandeira et al., 2014; Bao et al., 2008; Barbeau et al., 2001; Francis and Haywood, 1992; Lanaro et al., 2009; Qari et al., 2012), IL-1 β (Bao et al., 2008; Cruz et al., 2015; Pathare et al., 2004; Qari et al., 2012), IL-6 (Bandeira et al., 2014; Nebor et al., 2011; Pathare et al., 2004; Qari et al., 2012), CRP (Protéine C-réactive ; Hedo et al., 1993; Kato et al., 2005; Nur et al., 2011), sVCAM-1 (Bao et al., 2008; Conran et al.,

2004; Duits et al., 1996; Kato et al., 2005; Nebor et al., 2011; Nur et al., 2011b; Saleh et al., 1999) et sP-sélectine (Faes et al., 2014; Kato et al., 2005; Mohan et al., 2006). D'autres études nuancent ces résultats en montrant des concentrations de ces molécules dans le plasma des adultes malades à l'état « stable » semblables à celles de sujets sains (Blann et al., 2008; Graido-Gonzalez et al., 1998; Saleh et al., 1999). Ces marqueurs sont généralement d'autant plus exprimés chez les patients en crise comparés aux sujets A/A (Ballas, 1995; Duits et al., 1996; Francis and Haywood, 1992; Gonçalves et al., 2001; Nur et al., 2011b; Pathare et al., 2004; Qari et al., 2012) et comparés aux patients S/S à l'état « stable » (Ballas, 1995; Duits et al., 1996; Gonçalves et al., 2001; Nur et al., 2011b; Pathare et al., 2004). Chez les enfants, les données sont nettement plus hétérogènes : la majorité des études documente des concentrations en TNF- α (Akohoue et al., 2007; Asare et al., 2010; Hibbert et al., 2005; Kuvibidila et al., 1997; Michaels et al., 1998; Walter et al., 2006), IL-1 β (Akohoue et al., 2007; Asare et al., 2010; Hibbert et al., 2005; Walter et al., 2006), IL-6 (Akohoue et al., 2007; Asare et al., 2010; Hatzipantelis et al., 2013; Veiga et al., 2013), IL-8 (Asare et al., 2010; Duits et al., 1998; Walter et al., 2006) similaires aux enfants sains tandis que CRP (Akohoue et al., 2007; Hibbert et al., 2005; Krishnan et al., 2010; Kuvibidila et al., 1997; Mohammed et al., 2010) , sVCAM-1 (Hatzipantelis et al., 2013; Krishnan et al., 2010; Kuvibidila et al., 2006) et sP-sélectine (Hatzipantelis et al., 2013; Krishnan et al., 2010) sont quasiment toujours plus élevées chez les enfants drépanocytaires et augmentent davantage au cours d'une CVO (Bargoma et al., 2005; Etienne-Julan et al., 2004; Hatzipantelis et al., 2013; Kanakoudi-Tsakalidou et al., 1997; Mohammed et al., 2010; Sakhalkar et al., 2004). Ainsi, l'activation endothéliale et l'adhérence exacerbée des cellules sanguines à l'endothélium persistantes à l'état « stable » rendent la balance état « stable »/CVO particulièrement fragile et le moindre facteur activant davantage l'endothélium et/ou l'adhérence pourra précipiter l'apparition d'une CVO (Pathare et al., 2003).

II - Mécanismes moléculaires pathogéniques de la drépanocytose: Inflammation, Stress Oxydant et Biodisponibilité du NO

Moécule/ Cellule	Type de molécules		Enfants – Etat Stable (vs. AA)	Enfants – CVO		Adultes – Etat Stable (vs. AA)	Adultes – CVO	
				Vs. AA	Vs. SS Etat Stable		Vs. AA	Vs. SS Etat Stable
Leucocytes	-	↑	Akohoue et al., 2007; Benkerrou et al., 2002; Buchanan and Glader, 1978; Etienne-Julan et al., 2004; Hibbert et al., 2005	Benkerrou et al., 2002; Buchanan and Glader, 1978	Buchanan and Glader, 1978	Ataga et al., 2008; Faes et al., 2014; Kato et al., 2005; Nebor et al., 2011; Saleh et al., 1999	Gonçalves et al., 2001; Nur et al., 2011	Ballas, 1995; Gonçalves et al., 2001; Nur et al., 2011
TNF-α	Pro- inflammatoire	↑	Veiga et al., 2013			Bandeira et al., 2014; Bao et al., 2008; Barbeau et al., 2001; Francis and Haywood, 1992; Lanaro et al., 2009; Qari et al., 2012	Francis and Haywood, 1992; Qari et al., 2012	
		=	Akohoue et al., 2007; Asare et al., 2010; Hibbert et al., 2005; Kuvibidila et al., 1997; Michaels et al., 1998; Walter et al., 2006	Benkerrou et al., 2002; Michaels et al., 1998	Benkerrou et al., 2002; Michaels et al., 1998; Sarray et al., 2015	Cruz et al., 2015; Graido-Gonzalez et al., 1998; Pathare et al., 2004	Graido-Gonzalez et al., 1998; Pathare et al., 2004	Francis and Haywood, 1992; Graido-Gonzalez et al., 1998; Pathare et al., 2004; Tavakkoli et al., 2004
IL-1β	Pro- inflammatoire	↑				Bao et al., 2008; Cruz et al., 2015; Pathare et al., 2004; Qari et al., 2012	Pathare et al., 2004; Qari et al., 2012	
		=	Akohoue et al., 2007; Asare et al., 2010; Hibbert et al., 2005; Walter et al., 2006			Graido-Gonzalez et al., 1998	Graido-Gonzalez et al., 1998	Graido-Gonzalez et al., 1998; Pathare et al., 2004
IL-6	Pro-/Anti- inflammatoire	↑	Hibbert et al., 2005; Walter et al., 2006		Sarray et al., 2015	Bandeira et al., 2014; Nebor et al., 2011; Pathare et al., 2004; Qari et al., 2012	Duits et al., 1996; Pathare et al., 2004; Qari et al., 2012	Pathare et al., 2004
		=	Akohoue et al., 2007; Asare et al., 2010; Hatzipantelis et al., 2013; Veiga et al., 2013	Hatzipantelis et al., 2013		Barbeau et al., 2001; Duits et al., 1996; Graido-Gonzalez et al., 1998; Saleh et al., 1999	Graido-Gonzalez et al., 1998	Graido-Gonzalez et al., 1998
IL-8	Pro- inflammatoire	↑	Akohoue et al., 2007; Michaels et al., 1998	Duits et al., 1998	Duits et al., 1998; Etienne-Julan et al., 2004	Lanaro et al., 2009; Pathare et al., 2004; Qari et al., 2012 Graido-Gonzalez et al., 1998; Saleh et al., 1999	Gonçalves et al., 2001; Pathare et al., 2004; Qari et al., 2012	Gonçalves et al., 2001
		=	Asare et al., 2010; Duits et al., 1998; Walter et al., 2006	Michaels et al., 1998			Graido-Gonzalez et al., 1998	Graido-Gonzalez et al., 1998; Pathare et al., 2004
IL-10	Anti- inflammatoire	↑	Veiga et al., 2013; Walter et al., 2006			Qari et al., 2012	Graido-Gonzalez et al., 1998; Qari et al., 2012	
		=	Akohoue et al., 2007; Asare et al., 2010			Graido-Gonzalez et al., 1998; Lanaro et al., 2009		Graido-Gonzalez et al., 1998
		↓	Hibbert et al., 2005		Sarray et al., 2015			
CRP	Protéine Phase Aigüe	↑	Akohoue et al., 2007; Hibbert et al., 2005; Krishnan et al., 2010; Kuvibidila et al., 1997; Mohammed et al., 2010		Bargoma et al., 2005; Etienne-Julan et al., 2004; Hatzipantelis et al., 2013; Mohammed et al., 2010	Hedo et al., 1993; Kato et al., 2005; Nur et al., 2011	Ballas, 1995; Nur et al., 2011	Ballas, 1995; Nur et al., 2011; Pathare et al., 2004
		=				Barbeau et al., 2001		
sVCAM-1	Pro-adhésive	↑	Hatzipantelis et al., 2013; Krishnan et al., 2010; Kuvibidila et al., 2006	Kanakoudi- Tsakalidou et al., 1997; Stuart and Setty, 1999	Kanakoudi-Tsakalidou et al., 1997; Sakhalkar et al., 2004	Bao et al., 2008; Conran et al., 2004; Duits et al., 1996; Kato et al., 2005; Nebor et al., 2011; Nur et al., 2011; Saleh et al., 1999	Duits et al., 1996; Nur et al., 2011	Duits et al., 1996
sP- sélectine	Pro-adhésive	↑	Hatzipantelis et al., 2013; Krishnan et al., 2010		Hatzipantelis et al., 2013	Faes et al., 2014; Kato et al., 2005; Mohan et al., 2006		
		=				Blann et al., 2008; Cruz et al., 2015; Duits et al., 1996	Duits et al., 1996	Duits et al., 1996

Tableau 3. Variations de modulateurs de l'inflammation chez des populations drépanocytaires pédiatriques et adultes au cours d'une CVO comparés à des sujets drépanocytaires à l'état stable ou à des sujets sains.

B. DRÉPANOCYTOSE ET ALTÉRATION DE LA BALANCE OXYDANTE

1. Le stress oxydant

En conditions physiologiques, l'excédent de production d'espèces réactives de l'oxygène (=ROS : « Reactive Oxygen Species »), agents pro-oxydants est pris en charge par les composés antioxydants afin de maintenir l'homéostasie. Par ailleurs, lorsqu'ils sont présents en concentrations modérées, les ROS jouent un rôle physiologique dans les processus apoptotiques (Buttke and Sandstrom, 1994), phagocytaires (Rahal et al., 2014) et dans la transmission du signal en général (Duracková, 2010). En revanche, dès lors que la production de ROS devient trop abondante, la saturation des systèmes antioxydants provoque un déséquilibre de la balance oxydante que l'on définit sous le terme de « stress oxydant » (Sies, 1997). Ce dernier peut survenir dans des conditions physiologiques particulières telles que l'exercice physique (Fisher-Wellman and Bloomer, 2009), l'hypoxie (Miyata et al., 2011). Les conséquences de ce stress sont l'oxydation des macromolécules d'origine lipidiques (Gutteridge and Halliwell, 1990), protéiques (Stadtman, 1992) et/ou l'ADN (Henle et al., 1996). La répétition des attaques oxydantes entraîne des dommages cellulaires et tissulaires, stimule les processus inflammatoires et est ainsi impliquée dans la pathogenèse de nombreuses maladies neurodégénératives (Uttara et al., 2009), cardiovasculaires (Dhalla et al., 2000), métaboliques (Le Lay et al., 2014) et cancers (Sosa et al., 2013).

a. Les espèces réactives de l'oxygène

Au niveau de la chaîne mitochondriale de transport des électrons, les étapes intermédiaires de réduction de l'oxygène moléculaire en eau vont fournir des métabolites hautement réactifs tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2), l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$) potentiellement nuisibles aux structures cellulaires (Chirico and Pialoux, 2012). L'anion superoxyde est formé lorsque l'oxygène reçoit un électron supplémentaire et constitue le radical libre le plus commun. Il est produit en grande quantité par les leucocytes lors de la mise

en place des processus inflammatoires (Scheibmeir et al., 2005) et par les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale (Valko et al., 2007). L' $O_2^{\cdot-}$ peut réagir avec le NO pour former du peroxy-nitrite ($ONOO^-$), un composé toxique du métabolisme du NO. Certains systèmes antioxydants sont capables de dismuter l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 qui n'est alors pas considéré comme un radical libre mais est bien un membre de la famille des ROS, potentiel « nuisible » cellulaire. En présence d'ion ferreux Fe^{2+} , l' H_2O_2 pourra à son tour être transformé en $\cdot OH$, radical libre hautement réactif et toxique, via la réaction de Fenton (Valko et al., 2007). Selon les conditions environnementales (e.g. hypoxie) et le type de cellules/organites concernés, différents systèmes peuvent être responsables de la production de ces ROS.

b. Sources physiologiques de ROS

➤ *Chaîne respiratoire mitochondriale* : au cours de la transmission d'énergie, une faible quantité d'électrons vont fuir prématurément des complexes enzymatiques I et III de la chaîne de transport mitochondriale. En conditions basales non pathologiques, 1 à 4% de l' O_2 est transformé en $O_2^{\cdot-}$ via cette fuite d'électrons (Lenaz, 1998). On observe une augmentation des oxydations phosphorylantes et/ou une fuite d'électrons plus importante avec une surproduction d' $O_2^{\cdot-}$ concomitante dans des conditions particulières telles que l'exercice physique (Urso and Clarkson, 2003), l'hypoglycémie (Singh et al., 2004), l'hypoxie/réoxygénation (Li and Jackson, 2002), etc.

➤ *Système xanthine oxydoréductase* : L'enzyme cytosolique xanthine oxydoréductase est inter-convertible en xanthine oxydase (XO) ou xanthine déshydrogénase (XDH) (Elahi et al., 2009). Cette enzyme intervient dans le métabolisme de l'acide urique à partir de l'hypoxanthine et de la xanthine (Figure 20). Suivant les conditions d'oxygénation, l'une ou l'autre des formes métabolisera la réaction. Ainsi en conditions ischémiques, l'ATP est catabolisé en ADP, AMP puis hypoxanthine, qui est alors pris en charge par la XDH utilisant le $NADP^+$ comme cofacteur pour former du NADPH et de la xanthine. Cette dernière est ensuite transformée en acide urique par la XDH + $NADP^+$. Dès lors que l'oxygénation

redevient suffisante (= reperfusion), c'est la XO qui métabolise l'hypoxanthine et la xanthine en utilisant comme cofacteur l' O_2 pour former de l'acide urique et de l' $O_2^{\cdot-}$ (Figure 20) (Chirico and Pialoux, 2012). La XO constitue alors un fournisseur non négligeable de ROS lors de la phase de reperfusion.

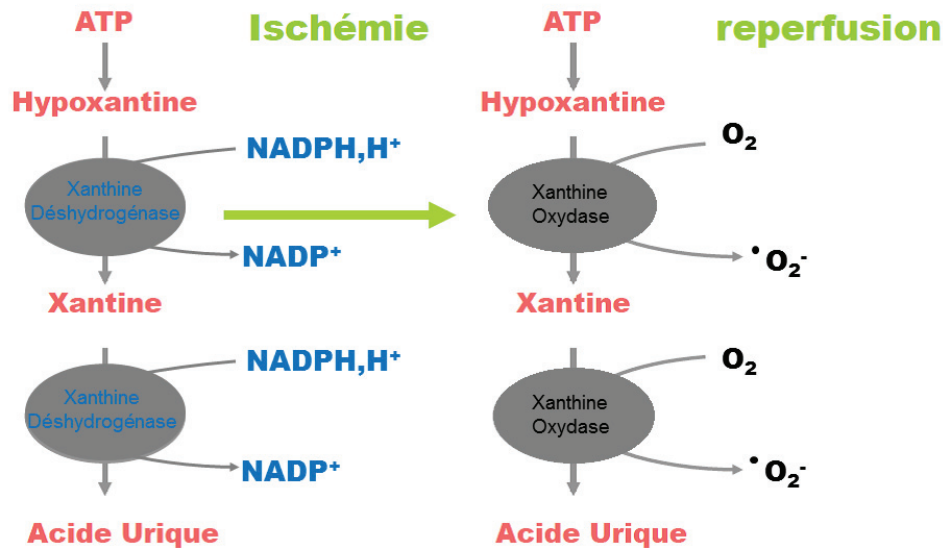


Figure 20. Effet de l'ischémie-reperfusion sur le système xanthine oxydo-réductase.

Dans un environnement pauvre en oxygène, l'hypoxanthine est transformée en acide urique grâce à la xanthine déshydrogénase et le cofacteur NADPH. Au moment de la reperfusion, c'est la xanthine oxydase qui, en consommant de l' O_2 , forme de l'acide urique et de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ à partir d'hypoxanthine.

➤ **Système NADPH oxydase :** la famille des NADPH oxydases (NOX) regroupe un ensemble de protéines qui transfèrent les électrons à travers les membranes pour réduire l' O_2 en $O_2^{\cdot-}$ (Paravicini and Touyz, 2008). Il existe 7 isoformes de NOX qui s'expriment différemment suivant les tissus, NOX2 étant la forme la plus répandue, majoritairement présente dans les phagocytes (Bedard and Krause, 2007). En conditions basales, NOX2 est liée de façon constitutive à $p22^{phox}$ et est stockée dans des vésicules intracellulaires (Figure 21). Lors de la phagocytose, le mécanisme de « Respiratory burst » se met en place (Knight, 2000). Brièvement, la sous-unité « organisatrice » $p47^{phox}$ change de conformation après avoir été phosphorylée et se lie à $p22^{phox}$. Le déplacement de $p47^{phox}$ entraîne la fixation de la sous-unité activatrice $p67^{phox}$ et de $p40^{phox}$ au complexe enzymatique NOX. Une fois ce

complexe activé, il y a fusion entre la vésicule et la membrane plasmique du phagocyte (Bedard and Krause, 2007). Le NADPH est alors utilisé comme donneur d'électrons pour réduire l' O_2 en O_2^- qui sera ensuite rapidement dismuté en H_2O_2 . Mais l' H_2O_2 , faiblement microbicide, sera à son tour transformé en anions hypochlorite (ClO^-), composé halogéné extrêmement toxique pour les agents microbiens, par l'enzyme myéloperoxydase (Babior, 1984). Ainsi dans des conditions pro-inflammatoires, la quantité de phagocytes activés augmente et par conséquent, la production de ROS médiée par la NADPH oxydase est exacerbée (Iles and Forman, 2002).

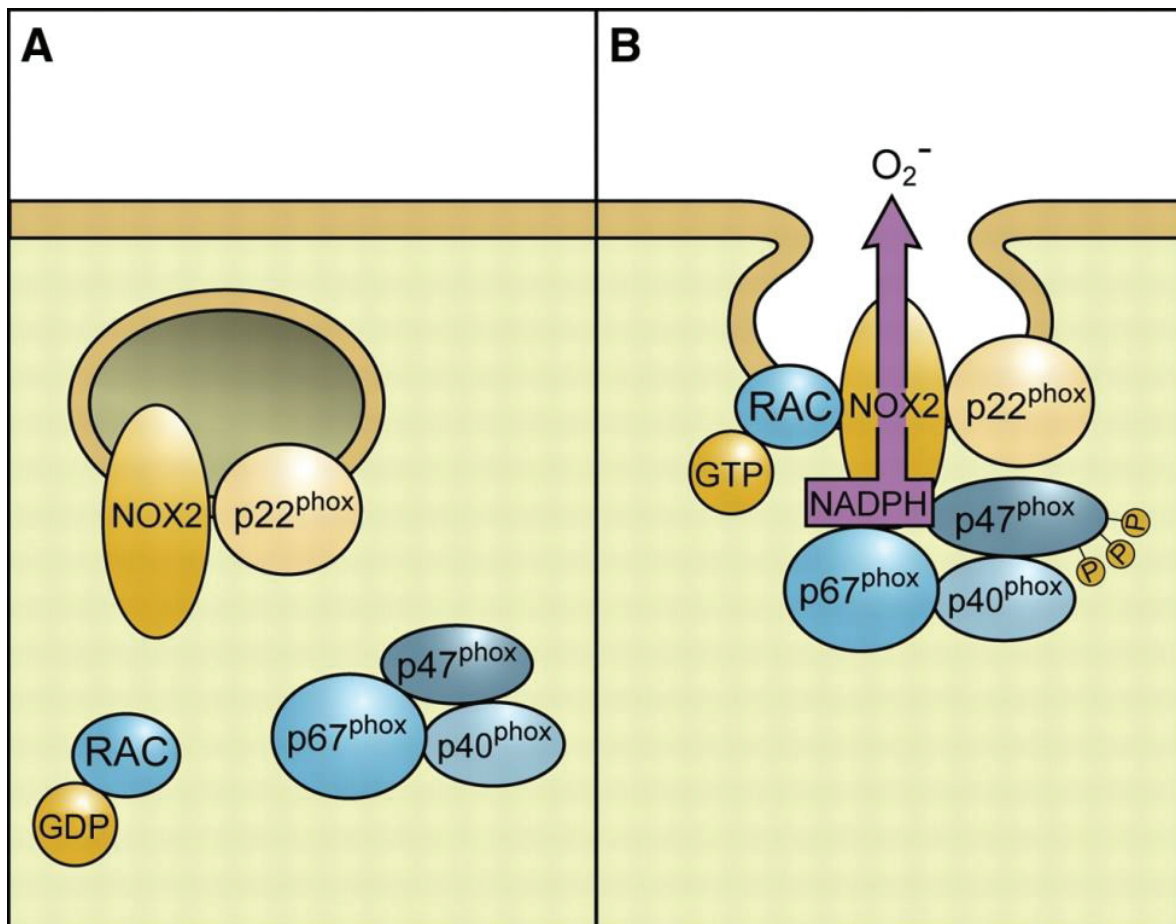


Figure 21. Assemblage de la NADPH oxydase au niveau membranaire.

A : Etat basal, les différentes sous-unités sont stockées dans le cytosol. **B :** Assemblage des différentes sous-unités du complexe NADPH oxydase après un stimulus inflammatoire. Tiré de (Bedard and Krause, 2007).

➤ *Découplage de la NO Synthase endothéliale (eNOS)* : La NO synthase (NOS) est l'enzyme de transformation de la L-arginine. Il existe 3 isoformes de cette enzyme : nNOS (neuronale) ou NOS1, étant la forme prédominante du tissu neuronal ; iNOS (inductible) ou NOS2 qui est une forme « inductible » dans de nombreux types cellulaires et eNOS (endothéliale) ou NOS3, majoritairement exprimée dans les cellules endothéliales (Alderton et al., 2001). Les différences existantes entre ces isoformes sont qu'eNOS et nNOS sont constitutives et Ca^{2+} -dépendantes alors qu'iNOS est inductible et Ca^{2+} -indépendante (Michel and Feron, 1997). Ces enzymes sont formées par l'association de deux monomères, chacun constitué d'un domaine N-terminal à fonction « oxygénase » contenant des sites de liaison à l'hème, au cofacteur BH_4 (tétrahydroptéridine) et à la L-arginine lié - par un site de reconnaissance de la calmoduline - à un second domaine C-terminal à fonction « réductase » qui fixe les coenzymes NADPH, FMN et FAD (Figure 22) (Alderton et al., 2001). Au niveau vasculaire, en conditions normales, c'est-à-dire lorsque le Ca^{2+} et les cofacteurs sont présents en quantités suffisantes, eNOS génère un niveau basal de NO et de citrulline à partir de L-arginine et d' O_2 . En revanche, une réduction de la concentration en cofacteur BH_4 ou en L-arginine entraîne le découplage entre le flux d'électrons allant jusqu'à l' O_2 et l'oxydation de la L-arginine conduisant à la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ plutôt que de NO (Alkaitis and Crabtree, 2012).

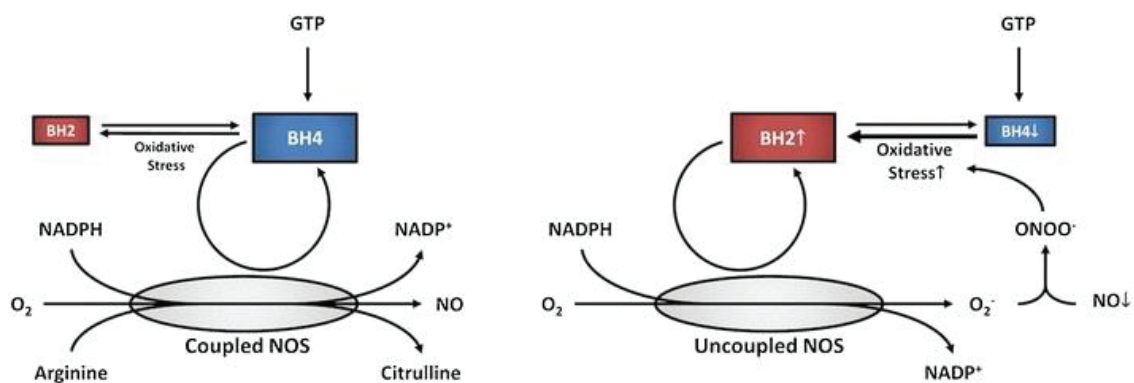


Figure 22. Déterminants du découplage de la NO synthase.

À gauche : En conditions basales, la NO Synthase endothéliale (eNOS) produit du NO, du NADP^+ et de la citrulline à partir d' O_2 , de NADPH et d'arginine à l'aide du cofacteur BH_4 (Tétrahydrobioptéridine). **À droite :** Lorsque le stress oxydant augmente, la synthèse de BH_2 est privilégiée. eNOS est découplée et produit de l'anion superoxyde. Tiré de (Alkaitis and Crabtree, 2012).

c. Dommages oxydants sur l'ADN, les lipides et les protéines

A fortes concentrations, les ROS causent de sévères dommages à l'ensemble de la cellule en affectant l'ADN, les lipides et les protéines.

Au niveau nucléaire, le radical hydroxyle s'attaque aux bases purines et pyrimidines composant la double hélice (Valko et al., 2007). La 8-hydroxyguanine (8-OH-G), résultant de la réaction entre $\cdot\text{OH}$ et une guanine, est le premier découvert et le plus étudié des produits oxydés de l'ADN et constitue un biomarqueur de choix pour estimer l'ampleur des dommages oxydants sur l'ADN (Halliwell, 2000). Des modifications récurrentes du matériel génétique initient les mécanismes de mutagenèse, carcinogenèse et de vieillissement (Valko et al., 2006).

Les acides gras polyinsaturés sont les plus susceptibles d'être peroxydés. En présence d' $\cdot\text{OH}$, l'atome d'hydrogène se détache facilement des doubles liaisons dont sont riches les acides gras polyinsaturés qui deviennent alors des radicaux peroxydes ($\text{RO}\cdot$) (Carocho and Ferreira, 2013). Une fois formés, ces $\text{RO}\cdot$ peuvent être réarrangés, après une réaction de cyclisation, en endoperoxydes dont les produits finaux particulièrement toxiques sont le malondialdéhyde (MDA) et 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE). Le MDA peut altérer la stabilité de l'HbA et présente des effets mutagènes et carcinogènes et le 4-HNE est hautement cytotoxique et joue le rôle de second messenger des ROS dans la signalisation cellulaire (Ayala et al., 2014). De par leur pertinence dans l'évaluation de l'état oxydant, ils sont tous deux fréquemment utilisés comme biomarqueurs par la communauté de recherche biomédicale. Les F_2 -isoprostanes ont été identifiés comme étant une autre famille de marqueurs fidèles de peroxydation lipidique (Palmieri and Sblendorio, 2007). Ces analogues stables des prostaglandines de type F_2 sont issus de l'oxydation non-enzymatique de l'acide arachidonique et sont détectables dans l'ensemble des tissus humains y compris les fluides biologiques tels que le plasma, l'urine, la bile et le liquide céphalo-rachidien (Milne et al., 2007).

L'oxydation par les ROS des chaînes d'acides aminés peut conduire à la formation de protéines carbonylées. Ces sous-produits sont plus stables que les lipides peroxydés

mais restent de bons indicateurs du statut oxydant général (Dalle-Donne et al., 2003). L'acide hypochloreux produit par les phagocytes peut également réagir avec les résidus tyrosine des protéines pour former au final des produits avancés d'oxydation des protéines, AOPP (Advanced Oxidation Protein Products). Des taux d'AOPP plasmatiques élevés sont associés à un grand nombre de désordres pathologiques (Chiu-Braga et al., 2006; Descamps-Latscha et al., 2005; Kaneda et al., 2002; Witko-Sarsat et al., 1998). Enfin, à la suite d'une chaîne de réaction complexe, les protéines peuvent réagir avec des produits issus de la glyco-oxydation ou de la peroxydation lipidique pour former des AGEs (Advanced Glycation End Products) (Valko et al., 2007). Au niveau cellulaire ils se fixent sur un récepteur spécifique, RAGE dont les mécanismes sont détaillés dans le chapitre IV.

2. Les systèmes antioxydants

Par définition, un antioxydant est toute substance qui retarde voire inhibe les dommages oxydants d'une molécule cible (Halliwell, 2007). Suivant la nature du stress oxydant et le compartiment cellulaire, différents systèmes, enzymatiques ou non, se mettent en place pour lutter efficacement contre l'excès de ROS.

a. Les antioxydants enzymatiques

Au sein de ce groupe d'antioxydants, on distingue les défenses enzymatiques primaires des secondaires qui vont avoir respectivement un rôle antioxydant direct en neutralisant les ROS ou un rôle indirect de production de métabolites ayant des propriétés antioxydantes (Carocho and Ferreira, 2013). Trois enzymes composent le système de défenses primaire : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et les peroxydases (Glutathion Peroxydase, GPx et Peroxyrédoxine, Prx) (Figure 23).

➤ *Superoxyde dismutase* : La SOD est une métalloprotéine existant sous trois isoformes, SOD1 (CuZn-SOD), forme cytoplasmique avec un centre catalytique cuivre-zinc-dépendant ; SOD2 (MnSOD), mitochondriale utilisant le manganèse comme cofacteur ; SOD3 (EC-SOD), extracellulaire qui lie le cuivre et le zinc également (Zelko

et al., 2002). Quel que soit le métal fixé, les SODs catalysent la dismutation d' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 .

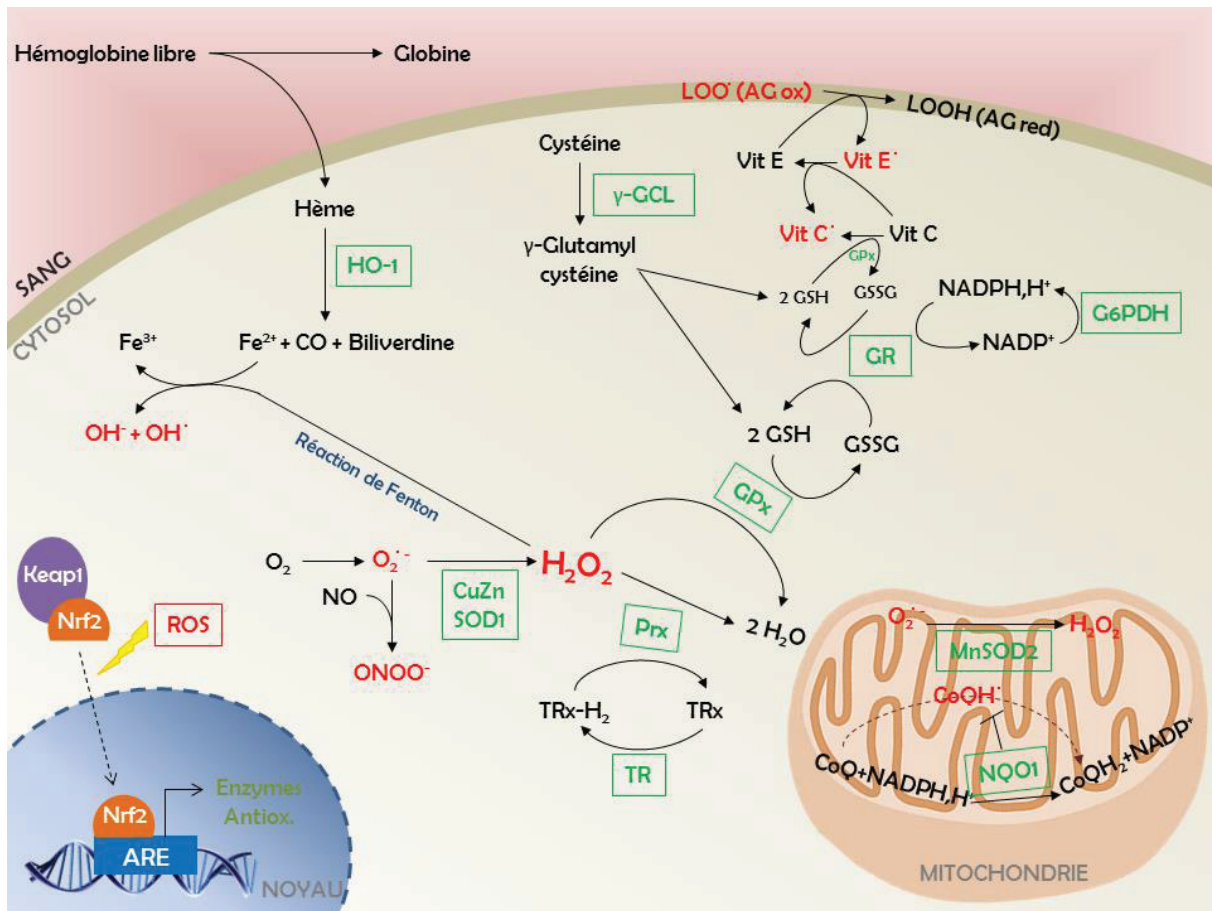


Figure 23. Systèmes antioxydants dans une cellule endothéliale.

En rouge, les agents pro-oxydants. En vert, les enzymes antioxydantes. Lors de l'hémolyse, l'hémoglobine se dissocie et libère ses noyaux hèmes qui s'intercalent dans la membrane plasmique. L'hème est hautement réactif et génère un stress oxydant qui est détecté par Keap1, protéine redox-sensible séquestrant Nrf2 à l'état basal. La protéine Keap1 change alors de conformation, le complexe Keap1-Nrf2 n'est plus reconnu par le protéasome. Les protéines Keap1 sont saturées en Nrf2 et les Nrf2 néosynthétisés se retrouvent libres dans le cytosol, puis transloquent dans le noyau où ils se fixent au niveau des ARE situés dans la région promotrice des gènes de la plupart des enzymes antioxydantes. Ces enzymes fonctionnent de façon synergique et complémentaire pour lutter efficacement contre l'excès d'agents pro-oxydants et limiter ainsi les dommages cellulaires. **Fe³⁺** : ion ferrique ; **Fe²⁺** : ion ferreux ; **CO** : Monoxyde de carbone ; **HO-1** : Hème oxygénase-1 ; **γ-GCL** : γ-glutamyl cystéine ligase ; **LOO·** : Acide gras (AG) peroxydé ; **LOOH** : AG réduit ; **Vit E** : Vitamine E réactive ; **Vit C** : Vitamine C réactive ; **GPx** : Glutathion peroxydase ; **GSH** : Glutathion réduit ; **GSSG** : Glutathion oxydé ; **G6PDH** : Glucose 6-phosphate déshydrogénase ; **GR** : Glutathion réductase ; **Keap1** : Kelch-like ECH-associated protein-1 ; **Nrf2** : Nuclear factor erythroid-related factor-2 ; **ARE** : Antioxidant response element ; **O₂^{·-}** : anion superoxyde ; **ONOO·** : peroxynitrite ; **H₂O₂** : peroxyde d'hydrogène ; **Prx** : Peroxyredoxine ; **TRx-H₂** : Thioredoxine réduite ; **TRx** : Thioredoxine oxydée ; **TR** : Thioredoxine réductase ; **CoQ** : Coenzyme Q ; **CoQH·** : radical Coenzyme Q réduite ; **CoQH₂** : Coenzyme Q réduite.

➤ *Catalase* : La catalase est une enzyme peroxysomale contenant un noyau porphyrine et a un fonctionnement extrêmement rapide (Chaudière and Ferrari-Iliou, 1999). Cette enzyme utilise comme substrat l' H_2O_2 formé par la SOD pour produire de l'eau et de l'oxygène moléculaire. Elle pourra alors convertir 6 millions de molécules d' H_2O_2 toutes les minutes (Rahman, 2007).

➤ *Peroxydases* : La GPx est une enzyme tétramérique sélénium-dépendante présente abondamment dans les compartiments cytosoliques et mitochondriaux (Chaudière and Ferrari-Iliou, 1999). Elle catalyse notamment la transformation de l' H_2O_2 en eau avec oxydation simultanée du glutathion (GSH ; Figure 23) (Rahman, 2007). La Prx est dimérique avec un résidu cystéine « peroxidatique » qui sera oxydé en acide sulfénique par l' H_2O_2 . La réaction catalytique de la Prx nécessite donc de l' H_2O_2 ainsi que de la thiorédoxine réduite (TRx- H_2) pour former de l'eau et de la thiorédoxine oxydée (Jara et al., 2007).

Le système de défenses secondaire englobe notamment la glutathion réductase (GSR), la thiorédoxine réductase (TR) et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD ; Figure 23). GSR et TR permettent de recycler les cofacteurs réduits GSH et TRx- H_2 respectivement à partir de leur forme oxydée et facilitent donc l'activité antioxydante des peroxydases (Arnér and Holmgren, 2000; Carocho and Ferreira, 2013). La G6PD régénère le coenzyme réduit NADPH et maintient un milieu pro-réducteur propice à l'action de la GSR et de la TR (Ratnam et al., 2006).

b. Les antioxydants non-enzymatiques

Bien qu'une grande variété d'antioxydants non-enzymatiques existe, la quantité produite de façon endogène n'est pas suffisante pour protéger les cellules des attaques oxydantes et nécessite d'être complétée par l'alimentation (Carocho and Ferreira, 2013).

Parmi ces composés non-enzymatiques, les vitamines jouent un rôle important de neutralisation des ROS (Figure 23). Ainsi, le β -carotène, précurseur liposoluble de la vitamine A est un puissant piègeur de l'oxygène singulet 1O_2 , membre hautement

réactif de la famille des ROS (Clarkson and Thompson, 2000). La vitamine A pourrait également stopper la réaction en chaîne aboutissant à la peroxydation lipidique (Palace et al., 1999). L' α -tocophérol ou vitamine E, est liposoluble et présent dans le plasma, les GRs et les tissus. Il court-circuite la peroxydation lipidique en donnant l'hydrogène de son noyau phénol, accompagné d'un électron au radical lipidique peroxyde (R-O \dot{O}) pour former un lipide peroxydé stable (R-OOH). Bien que le tocophéroxyle ainsi formé devienne à son tour un radical, c'est un composé très stable et inactif qui pourra être recyclé en α -tocophérol par la vitamine C (Figure 23; Carocho and Ferreira, 2013). L'acide ascorbique (ou Vitamine C), est également un piègeur efficace d' H_2O_2 , d' 1O_2 , d' $O_2^{\cdot-}$ et d' $\cdot OH$ (Barros et al., 2011).

Le glutathion, tripeptide endogène, protège également les cellules des dommages radicalaires en donnant un hydrogène et passant ainsi de sa forme réduite GSH à sa forme oxydée GSSG (Figure 23). Il participe aussi au recyclage d'autres antioxydants comme l'acide ascorbique (Carocho and Ferreira, 2013).

Les composés azotés, comme l'acide urique empêchent l'hémoglobine de réagir avec les peroxydes limitant donc la peroxydation lipidique intra-érythrocytaire et par conséquent l'hémolyse (Ames et al., 1981).

c. Le facteur de transcription clé des défenses antioxydantes : Nrf2

Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) est un facteur de transcription ubiquitaire redox-sensitif. En conditions normales, de faibles concentrations de Nrf2 sont maintenues grâce à la protéine régulatrice Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) qui séquestre Nrf2 dans le cytosol et facilite sa dégradation dans le protéasome après ubiquitinylation (Figure 23 ; Bryan et al., 2013). En revanche, lorsque la cellule subit un stress oxydant, les résidus cystéine de Keap1 sont modifiés entraînant un changement conformationnel de l'ensemble de la protéine. Le site de liaison de faible affinité de Keap1 se détache de Nrf2 et perturbe le transfert des ubiquitines sur le complexe protéique empêchant sa reconnaissance puis dégradation par le protéasome (Bryan et al., 2013). La saturation en Nrf2 des molécules de Keap1 permet aux protéines Nrf2 nouvellement synthétisées de

transloquer librement dans le noyau. Une fois dans le compartiment nucléaire, Nrf2 se lie à l'élément de réponse antioxydante situé dans la région promotrice de plus de 100 gènes codant pour des protéines cytoprotectrices (dont SOD, catalase, GPx, Prx, TR, PR, G6PD citées précédemment) (Dinkova-Kostova and Talalay, 2010). Parmi celles-ci, se trouve aussi l'hème oxygénase-1 (HO-1) qui a un rôle critique dans l'inflammation et le stress oxydant. HO-1 est la forme inducible NADPH-dépendante de l'hème oxygénase et catalyse la dégradation de l'hème en biliverdine, Fe^{2+} et CO (Figure 23). Des études *in vitro* montrent que la biliverdine et sa forme réduite, la bilirubine inhibent la formation de nitrotyrosine et la production de ROS mitochondriaux, piègent l' $O_2^{\cdot-}$ et empêchent le roulement, l'adhésion et la transmigration leucocytaire (Jansen et al., 2010; Kim et al., 2010). Le Fe^{2+} stimule la production de ferritine qui réduit le « pool » cellulaire de fer libre (Golbidi et al., 2012). Dans le cytoplasme des cellules musculaires lisses vasculaires, le CO se fixe sur la guanylate cyclase soluble qui stimule la voie de la protéine kinase G. Il en résulte une réduction de la concentration cytosolique en Ca^{2+} et une stimulation de la phosphatase des chaînes légères de myosine et aboutit à la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires (Siow et al., 1999). Le pouvoir vasodilatateur du CO est également directement médié par l'activation d'un canal potassium Ca^{2+} -dépendant causant une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses vasculaires (Kanu et al., 2006). Contrairement à HO-1 qui dispose d'autres inducteurs tels que FoxO (Kang et al., 2014), HIF-1 α , c-Jun, AP-1 (Yeligar et al., 2010), l'enzyme NADPH quinone oxydoréductase-1 (NQO-1) semble plus finement régulée par Nrf2 (Anwar-Mohamed et al., 2011; Chartoumpakis et al., 2013; Jyrkkänen et al., 2008). Cette enzyme catalyse la réduction des quinones pour générer des hydroxyquinones stables en empêchant la formation de semiquinones hautement réactives (Figure 23). Elle est également capable de piéger l' $O_2^{\cdot-}$ en s'auto-oxydant (Siegel et al., 2004).

3. Le déséquilibre de la balance entre les mécanismes pro- et antioxydants dans la drépanocytose

L'ensemble des manifestations cliniques de la drépanocytose telles que la polymérisation/falciformation, l'hémolyse et les CVOs vont dérégler la balance oxydante en faveur de la production de ROS. De nombreuses études font état, chez les patients drépanocytaires, de concentrations basales élevées en produits de peroxydation lipidique (Akohoue et al., 2007; Alsultan et al., 2010; Bao et al., 2008; El-Ghamrawy et al., 2014; Manfredini et al., 2008), de l'oxydation des protéines (Manfredini et al., 2008; Nur et al., 2010; Oztas et al., 2012; Somjee et al., 2005) et de l'oxydation de l'ADN (Bao et al., 2008; Nishank, 2015). Le statut antioxydant de ces patients est nettement plus discuté ; certaines études montrent une augmentation des concentrations en certaines enzymes antioxydantes (Das and Nair, 1980; Manfredini et al., 2008; Rusanova et al., 2010) tandis que d'autres font état d'une capacité antioxydante limitée (Abiodun et al., 2010; El-Ghamrawy et al., 2014; Fasola et al., 2007; Hasanato, 2006; Schacter et al., 1988) étant la conséquence ou bien la cause d'un stress oxydant exacerbé. Différents phénomènes moléculaires/cellulaires tels que l'auto-oxydation de l'HbS, l'hyperhémolyse, l'ischémie-reperfusion et l'inflammation vont promouvoir ce stress oxydant.

a. L'auto-oxydation de l'HbS

Lorsque le GR normal fixe de nouvelles molécules d'O₂, il génère transitoirement de l'O₂^{•-} suite au transfert d'électrons entre le fer porté par l'hème et l'oxygène. Simultanément, l'hème s'auto-oxyde pour donner de la méthémoglobine (metHb; Chirico and Pialoux, 2012). La réaction se produisant est alors la suivante : $\text{Hb-Fe}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{MetHb-Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\cdot-}$. Même si ce phénomène se produit aussi bien pour l'HbA que HbS, Hebbel et collaborateurs décrivent, en 1988, une auto-oxydation 1,7 fois plus rapide pour l'HbS que pour l'HbA (Hebbel et al., 1988). Mais dix ans plus tard, ils nuancent cette observation en montrant que ce serait l'environnement cytoplasmique pro-oxydant qui serait en cause et non les propriétés inhérentes de l'HbS (Sheng et al., 1998). L'important « turnover » métabolique survenant

notamment lors des cycles de polymérisation/dépolymérisation serait une source non négligeable de ROS (Akohe et al., 2007; Nur et al., 2011a). Ainsi, les drépanocytes généreraient deux fois plus de ROS que les érythrocytes normaux suite à l'exposition de la metHb à l' H_2O_2 (dérivant de la dismutation de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$) qui entraîne la dégradation de l'Hb et libère du fer. Ce fer réagit avec l' H_2O_2 restant pour produire de l' OH^{\cdot} (Hebbel et al., 1982).

b. L'hémoglobine libre

Dans la drépanocytose, l'hémolyse intravasculaire augmente de façon chronique, les concentrations plasmatiques en hémoglobine libre. L'haptoglobine, qui neutralise cette Hb libre est alors fortement mobilisée et saturée d'où les faibles concentrations dosées dans le plasma des patients drépanocytaires (Damanhoury et al., 2015; Nur et al., 2011a; Rees and Gibson, 2012). L'Hb libre non prise en charge par l'haptoglobine se dissocie en globine et hème. L'hème hydrophobe s'intercale facilement et rapidement dans les membranes plasmiques des cellules endothéliales environnantes où elle libère son fer hautement réactif. Ce dernier, via la réaction de Fenton produit de l' OH^{\cdot} qui endommage et active l'endothélium amplifiant la production de ROS (Nur et al., 2011a).

c. L'ischémie-reperfusion des CVOs

Au cours d'une CVO, le blocage du flux sanguin produit une ischémie localisée et transitoire. Dès lors que le sang riche en O_2 s'écoule à nouveau, des dommages oxydants importants sont infligés au tissu infarci notamment via la forte activité de la xanthine oxydase (Nur et al., 2011a). Osarogiagbon *et al.* ont montré une plus forte proportion de xanthine oxydase chez des souris drépanocytaires hypoxiées comparées à des souris saines et à des souris drépanocytaires en normoxie (Osarogiagbon et al., 2000). Aslan *et coll.* décrivent également une activité plasmatique de xanthine oxydase supérieure chez des souris et des patients S/S comparés à des contrôles (Aslan et al., 2001). La formation d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ est alors exacerbée et une augmentation de xanthine oxydase a été associée à une élévation de cytokines pro-inflammatoires (Kanczler et al., 2003).

d. L'inflammation chronique

Chez les patients drépanocytaires, les dommages vasculaires constamment subis entraînent une sollicitation permanente des globules blancs (Nur et al., 2011a). L'hyperleucocytose caractéristique des patients S/S est associée à une surproduction de ROS constante via l'action de la NADPH oxydase (Wood and Granger, 2007). Il semblerait que la relation entre l'inflammation et le stress oxydant soit bidirectionnelle puisque des souris chimères knock-out (KO) pour NOX2 ayant été transplantées avec de la moelle osseuse de souris β^S , présentent une adhésion leucocytaire et plaquettaire à l'endothélium atténuée. Les auteurs en concluent une contribution de l' O_2^- produit par la NADPH oxydase aux réponses pro-inflammatoires et pro-thrombotiques.

C. MODULATION DE LA VASOMOTRICITÉ DANS LA DRÉPANOCYTOSE

1. L'endothélium, un acteur essentiel de la régulation du tonus vasomoteur

Jusque dans les années 60, l'endothélium était considéré comme une simple barrière inerte séparant le milieu vasculaire et l'interstitium (Pries and Kuebler, 2006). Progressivement diverses études ont montré l'importance de cette couche de cellules dans les réponses physiologiques inflammatoires et face à un corps étranger mais aussi dans le développement de maladies tels que le diabète, la néphrite glomérulaire et l'athérosclérose (Florey, 1966). Depuis, la multiplication des travaux ne cesse d'alimenter la compréhension des nombreuses fonctions vitales (régulation de la perfusion, adhérence de cellules circulantes, échanges fluide/solutés, hémostasie/coagulation, angiogenèse...) de l'endothélium dont son rôle essentiel dans la régulation du tonus vasculaire (Pries and Kuebler, 2006). Les cellules endothéliales sécrètent, de façon paracrine, divers médiateurs qui modulent l'état de contraction des cellules musculaires lisses vasculaires en affectant leur concentration en ions Ca^{2+} (Lamas and Rodríguez-Puyol, 2012).

a. L'endothéline-1 : puissant agent vasoconstricteur

Il existe 3 isoformes d'endothéline, ET-1, ET-2 et ET-3 dont ET-1 est la forme majoritairement exprimée. Elle fait partie des agents vasoconstricteurs les plus puissants identifiés (Shireman and Pearce, 1996). Bien que les cellules musculaires lisses vasculaires, les cardiomyocytes, les leucocytes, les macrophages et les cellules gliales produisent de l'ET-1, ce sont les cellules endothéliales qui sécrètent de façon majoritaire et constitutive le peptide. La production d'ET-1 est régulée au niveau génique soit positivement par le TGF- β , le TNF- α , les interleukines, l'insuline et l'angiotensine II soit négativement par le NO, la prostacycline (PGI₂), l'hypoxie et les contraintes de cisaillement (« shear stress ») (Thorin and Webb, 2010). Les effets biologiques d'ET-1 sont médiés par deux récepteurs de la superfamille des récepteurs couplés à une protéine G (RCPG), ET_A et ET_B ayant des fonctions diverses suivant le type cellulaire sur lequel ils sont exprimés (Figure 24) (Lai et al., 2014). Lorsqu'ET_A et ET_B sont situés sur la membrane des cellules musculaires lisses vasculaires, ils assurent leur vasoconstriction via l'activation de la phospholipase C- β qui clive le PIP₂ en DAG + IP₃ et stimulent la libération cytoplasmique de Ca²⁺ depuis le réticulum endoplasmique. Lorsqu'ET_B est exprimé à la surface des cellules endothéliales, il a un effet rétroactif de clairance de l'ET-1 circulante. La conséquence de son activation serait une vasodilatation transitoire suite à la stimulation de NO et de PGI₂ (Lamas and Rodríguez-Puyol, 2012). Une élévation de la concentration plasmatique en ET-1 promeut l'inflammation, la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et est associée à de nombreuses conditions pathologiques tels que l'hypertension pulmonaire, l'insuffisance cardiaque, l'athérosclérose, le diabète, les maladies coronariennes...(Galié et al., 2004; Ivey et al., 2008; Ruschitzka et al., 2000; Stewart et al., 1992; Takahashi et al., 1990).

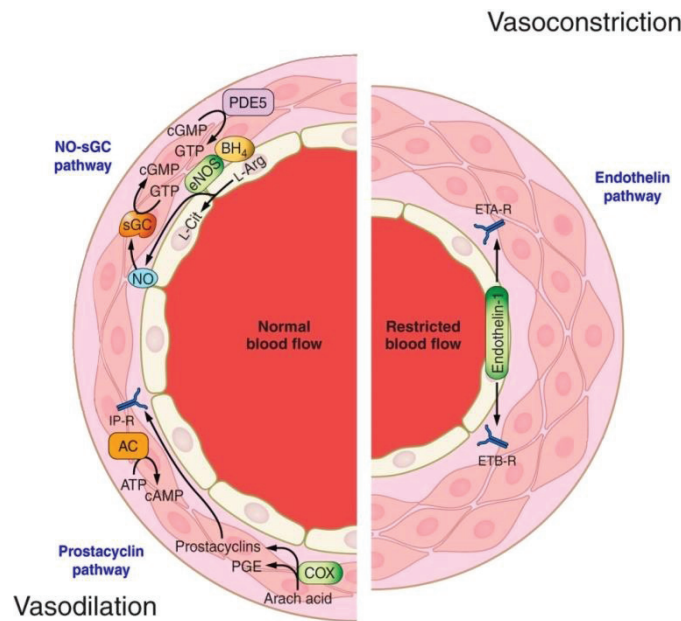


Figure 24. Effets du NO, de la prostacycline et de l'endothéline-1 sur le tonus vasomoteur.

Le NO active la vasodilatation via un mécanisme GMPc dépendant. La prostacycline active la vasodilatation via un mécanisme AMPc-dépendant. L'endothéline-1 stimule la vasoconstriction en se fixant à ses récepteurs ET_A et ET_B à la surface des cellules musculaires lisses. **PDE5** : phosphodiesterase 5 ; **L-Arg** : L-arginine ; **L-Cit** : L-citrulline ; **eNOS** : NO synthase endothéliale ; **BH₄** : tétrahydrobioptérine ; **GTP** : guanosine triphosphate ; **cGMP** : guanosine monophosphate cyclique ; **sGC** : guanylate cyclase soluble ; **Arach acid** : Acide arachidonique ; **COX** : cyclooxygénase ; **PGE** : Prostaglandine E ; **ATP** : adénosine triphosphate ; **AC** : adénylate cyclase ; **cAMP** : adénosine monophosphate cyclique ; **IP-R** : Récepteur à la prostacycline (=prostaglandine I_2).

b. Le rôle vaso-relaxant de la prostacycline

La PGI_2 est un métabolite de l'acide arachidonique suite à l'action successive de l'enzyme cyclo-oxygénase et de la prostacycline synthase au sein de la cellule endothéliale (Figure 24). Sa production est stimulée par des médiateurs endogènes tels que la bradykinine, histamine, thrombine, sérotonine ainsi que par de fortes contraintes de cisaillement (Shireman and Pearce, 1996). PGI_2 se fixe à un RCPG spécifique, l-prostanoïde (IP), localisé à la surface des cellules musculaires lisses vasculaires. Il en résulte une activation de l'adénylate cyclase qui augmente la concentration intracellulaire en AMPc qui stimule à son tour la protéine kinase A (Lai et al., 2014). S'en suit, une diminution de la concentration cytosolique en Ca^{2+} et/ou une inhibition de l'activité de la kinase de chaînes légères de myosine, toutes deux

conduisant à une relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires (Roux et al., 2012). En plus de son action vasodilatatrice, PGI_2 inhibe l'agrégation plaquettaire et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et aurait également des effets anti-inflammatoires et anti-thrombotiques (Lai et al., 2014).

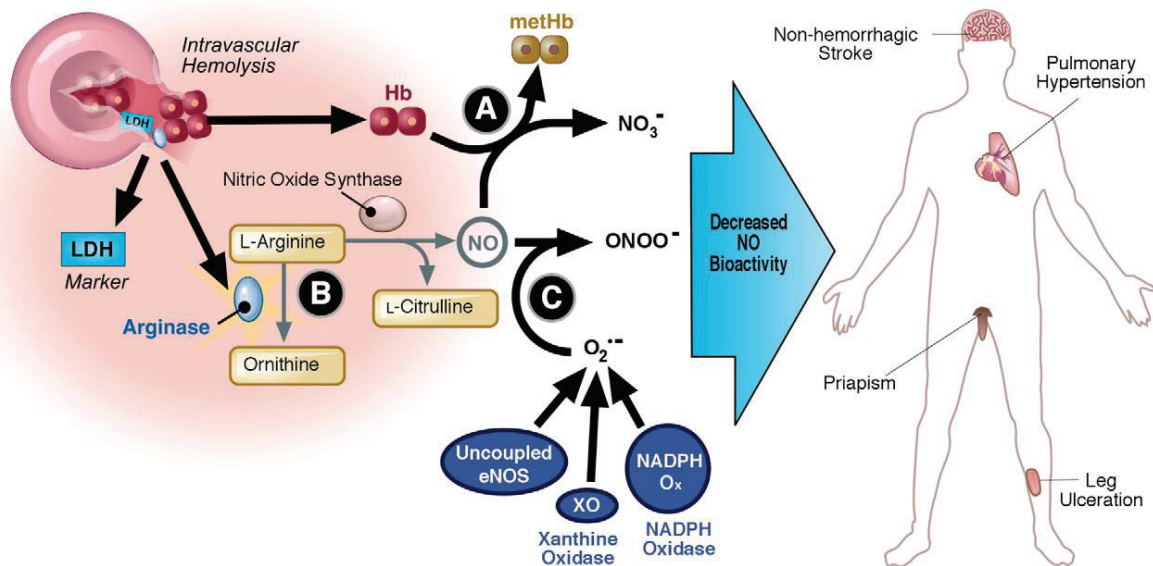


Figure 25. Métabolisme du NO dans la drépanocytose.

Lactate déshydrogénase (LDH), arginase et hémoglobine (Hb) sont libérées dans le plasma suite à l'hémolyse intravasculaire limitant la biodisponibilité du NO. Il réagit avec l'oxyhémoglobine libre pour former de la méthémoglobine et du nitrate (NO₃⁻) inerte (A). L-arginine, substrat de la synthèse du NO est transformée en ornithine par l'enzyme arginase (B). Les anions superoxyde (O₂⁻) produits par la xanthine oxydase, la NADPH oxydase et eNOS découplée réagissent avec le NO pour former le radical peroxynitrite ONOO⁻ réduisant d'autant plus la quantité de NO disponible (C). Cette déplétion en NO est associée à de nombreuses manifestations cliniques aiguës de la maladie : hypertension pulmonaire, priapisme, ulcères de jambes et potentiellement avec les AVC ischémiques. Extrait de (Wood et al., 2008).

c. L'oxyde nitrique : le vasodilatateur par excellence

Le NO est un composé liposoluble de formule chimique très simple diffusant donc facilement entre son lieu de production qu'est la cellule endothéliale vers son lieu d'action, la cellule musculaire lisse vasculaire (Shireman and Pearce, 1996). Comme décrit dans le paragraphe II.B.1.b., au niveau de l'endothélium, le NO est formé par la dégradation de la L-arginine en citrulline par l'enzyme eNOS (Figure 24). Elle est activée par des mécanismes hémodynamiques (contraintes de cisaillement) ou médiés par un récepteur (à la bradykinine, sérotonine, histamine, thrombine...) (Shireman and Pearce, 1996). Une fois formé, le NO se lie à la guanylate cyclase

soluble activant la voie de la protéine kinase G (Figure 24). Il en résulte une réduction de la concentration cytosolique en Ca^{2+} et une stimulation de la phosphatase des chaînes légères de myosine ce qui aboutit à la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires (Wood et al., 2008). Dans des conditions non pathologiques, le NO a également des propriétés antiprolifératives (sur les cellules musculaires lisses vasculaires) (Guh et al., 1998), anti-thrombotiques (Schäfer et al., 2004), antioxydantes (Durante et al., 1997) et antiadhésives (Spiecker et al., 1998).

2. La biodisponibilité du NO dans la drépanocytose

De par ses nombreux effets sur l'endothélium, le NO intéresse particulièrement la communauté scientifique dans la drépanocytose et les maladies vasculaires en général (Kaul et al., 2000). Chez les patient drépanocytaires, la synthèse de NO ainsi que la quantité utilisable sont drastiquement amoindries. Cette réduction de la biodisponibilité du NO est multifactorielle puisqu'elle est due soit à un piégeage du NO soit à un découplage de son enzyme de synthèse, la NOS endothéliale (Chirico and Pialoux, 2012).

a. La réaction délétère du NO avec l'anion superoxyde

L' O_2^- est un responsable majeur du piégeage du NO (Figure 25). Alors que dans un environnement sain, l' O_2^- est rapidement pris en charge par la SOD, sa surproduction chez les patients drépanocytaires entraîne une saturation du système de défenses et favorise sa réaction avec le NO pour former du peroxynitrite ONOO^- , un oxydant puissant (Huie and Padmaja, 1993). Sachant que l' O_2^- réagit trois fois plus rapidement avec le NO qu'avec la SOD, la genèse d' ONOO^- se trouve d'autant plus potentialisée chez les patients S/S (Gutierrez et al., 1996). A pH physiologique, l' ONOO^- peut être réduit en acide peroxynitrique ONOOH , qui pourra à son tour se décomposer en radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$ et dioxyde d'azote NO_2 (Beckman and Crow, 1993) causant une peroxydation lipidique et des dommages protéiques et nucléiques.

b. L'impact de l'hémoglobine libre et de l'arginase sur la biodisponibilité du NO

Suite aux processus hémolytiques, le contenu érythrocytaire, notamment riche en hémoglobine et arginase, est libéré dans le plasma. Ces deux protéines vont influencer sur le métabolisme du NO (Morris et al., 2008). L'Hb plasmatique réagit avec le NO et forme de la metHb et des ions nitrate NO_3^- , produits d'oxydation inactifs (Figure 25). L'Hb plasmatique peut également piéger indirectement le NO en générant des ROS (cf. II.B.3.b.). L'arginase est une enzyme qui catalyse la réaction de dégradation de la L-arginine et forme de l'ornithine. L'arginase entre alors en compétition avec la NOS pour métaboliser la L-arginine. Les fortes concentrations plasmatiques en arginase après hémolyse favorisent alors la formation d'ornithine au détriment de la citrulline et du NO (Wood et al., 2008).

c. Le découplage de la NO synthase endothéliale

La diminution de la disponibilité en arginine suite à sa dégradation par l'arginase, contribue au découplage de la NOS endothéliale et à la formation de ROS subséquente (Figure 25 ;(Wood et al., 2006)). Chez les patients drépanocytaires, le fort « turnover » érythrocytaire entraîne une surconsommation d'acide folique, elle-même à l'origine d'un hyperhomocystéinémie¹⁰ (Dhar et al., 2004). Cette dernière serait indirectement responsable du découplage d'eNOS en promouvant la formation d'ADMA (assymetric dimethylarginine), un inhibiteur compétitif de la L-arginine comme substrat de l'enzyme (Wood and Granger, 2007).

¹⁰ Augmentation dans le plasma de l'homocystéine, acide aminé ne pouvant pas être incorporé dans des protéines.

III. RÉPONSES INFLAMMATOIRES, OXYDANTES ET VASOMOTRICES À L'EXERCICE AIGU ET CHRONIQUE DANS LA DRÉPANOCYTOSE

A. RÉPONSES À L'EXERCICE AIGU EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES

1. Adaptations physiologiques à l'exercice aigu

Un exercice aigu est défini comme un ensemble de mouvements structurés et planifiés destinés spécifiquement à améliorer ou à maintenir la condition physique impliquant une élévation des besoins énergétiques et ayant une durée limitée dans le temps (Caspersen et al., 1985). Le passage de l'état de repos à l'exercice engendre un stress aigu qui requiert des modifications hémodynamiques, endocrines et métaboliques transitoires pour restaurer l'homéostasie (Horton and Beisel, 1994; Saltin, 1985).

a. *Modifications hématologiques par l'exercice aigu*

Au cours d'un exercice physique, l'apport sanguin s'ajuste précisément pour répondre à la demande des muscles actifs. De nombreuses études démontrent des modifications du volume plasmatique pendant et après l'exercice (Fry et al., 1992; Goodman et al., 1985; Irving et al., 1990; van Beaumont et al., 1981). Ainsi, lors d'efforts courts et intenses, les mécanismes de thermorégulation entraînent une perte d'eau par évaporation cutanée aboutissant à une hémococoncentration (Harrison, 1985). Elle se traduit par une diminution du volume plasmatique et une augmentation concomitante de l'hématocrite, de la concentration en Hb et du nombre de GRs (Gillen et al., 1991; Miles et al., 1983; Nagashima et al., 1995). Un exercice prolongé d'endurance induit également une diminution du volume plasmatique transitoire (McMurray, 1983; McNaughton, 1989; Novosadová, 1977). En plus de l'hypovolémie, l'hémococoncentration aurait pour origine une importante libération de GRs contenus dans la rate (Laub et al., 1993), un enrichissement plasmatique en protéines diverses provenant du système lymphatique (Teillet et al., 1991) et l'emprisonnement de l'eau dans les cellules musculaires dû à l'élévation de la pression oncotique suite à

l'accumulation de métabolites (tels que le lactate) (Novosadová, 1977). Les heures suivant l'exercice, qu'il soit à prédominance anaérobie ou aérobie, se caractérisent non pas par un retour à des niveaux basaux de volume plasmatique (et donc d'hématocrite, d'Hb et de GRs) mais par une hémodilution provisoire (Fellmann et al., 1989; Freund et al., 1987) (discuté dans le paragraphe III.B.1.a).

b. Impacts aigus de l'exercice sur les processus inflammatoires et d'adhérence vasculaire

Un des autres effets connus de l'exercice aigu est la modulation de la fonction immunitaire dont l'amplitude est dépendante de l'intensité et de la durée de l'exercice effectué (Gleeson, 2007). Ainsi, un exercice d'intensité modérée induit une élévation des leucocytes relativement faible tandis qu'un exercice de forte intensité double leur nombre par rapport au repos via une augmentation des lymphocytes et des neutrophiles (Nieman, 1994). Un exercice d'endurance prolongé tel que le marathon amplifie d'autant plus la leucocytose (nombre de GB multiplié par 3 voire 4) en mobilisant l'ensemble des tissus lymphoïdes dont la rate qui semble avoir une importance majeure (Nieman, 1994). Ces changements induits par l'exercice seraient étroitement liés aux concentrations sanguines en adrénaline et cortisol qui augmentent fortement pour des intensités supérieures à 60% de $\dot{V}O_2\text{max}$ (Nieman, 1994). De nombreuses études rapportent également une augmentation durée- et intensité-dépendante en IL-6 pendant et après un exercice aigu sans dommages musculaires associés (Drenth et al., 1995; Neubauer et al., 2008; Ostrowski et al., 1998; Pedersen and Fischer, 2007; Petersen and Pedersen, 2006; Zaldivar et al., 2006). IL-6 est libérée par les fibres musculaires actives où elle agit de façon similaire à une hormone (Pedersen and Fischer, 2007). Ainsi, bien qu'elle soit généralement décrite pour ses propriétés pro-inflammatoires, dans le cas de l'exercice aigu, IL-6 stimule la production d'IL-10 et d'IL-1ra (IL-1 receptor antagonist), cytokines anti-inflammatoires et réprime le TNF- α qui a été identifié comme médiateur de l'insulino-résistance (Febbraio and Pedersen, 2002). De plus, IL-6 stimule l'absorption du glucose par les cellules via l'activation du transporteur GLUT4 (Glucose transporter 4)

ainsi que l'oxydation des acides gras par la voie de l'AMP kinase (Pedersen and Fischer, 2007). Même si IL-6 est la première cytokine mise en jeu et la plus fortement activée pendant l'exercice, IL-8 a été classifiée, elle aussi, comme myokine (Frydelund-Larsen et al., 2007). Au cours de l'exercice, IL-8 aurait des effets chimiotactiques et angiogéniques après fixation sur ses récepteurs CXCR1 et CXCR2 respectivement (Pedersen and Fischer, 2007). L'exercice stimule en outre la libération d'IL-15 qui aurait un rôle à la fois dans les interactions muscle/tissu adipeux, en faveur de la réduction de la masse grasse et dans l'anabolisme musculaire (Nielsen and Pedersen, 2007; So et al., 2014). Les fluctuations en TNF- α et IL-1 β sont nettement plus controversées. Alors que certaines études décrivent une absence de variation du TNF- α et d'IL-1 β pré/post-exercice (Drenth et al., 1995; Ostrowski et al., 1998; Suzuki et al., 2006) d'autres montrent une élévation des concentrations urinaires, sériques ou plasmatiques de ces deux cytokines immédiatement après l'exercice (Nieman et al., 2001; Sprenger et al., 1992; Zaldivar et al., 2006). Ces augmentations sont intensité-indépendante et sont malgré tout, très modérées par rapport aux variations en IL-6. Sachant que le TNF- α agit principalement localement, il se pourrait que la transcription du TNF- α ne soit pas toujours reflétée par une augmentation systémique de ce facteur (Petersen and Pedersen, 2006). Il se pourrait également que le TNF- α stimule IL-6 qui entraîne alors un rétrocontrôle négatif sur celui-ci d'où un maintien relativement stable des taux en TNF- α au cours de l'exercice aigu (Petersen and Pedersen, 2006). En lien avec l'évolution du nombre de leucocytes, une élévation intensité-dépendante des taux circulants en molécules d'adhérence a été reportée (Marsh and Coombes, 2005). Tandis que l'exercice modéré n'altère pas les concentrations en sE-sélectine, sVCAM-1 ou sICAM-1 (Jilma et al., 1997), un exercice intense augmente sICAM-1 et sP-sélectine (Akimoto et al., 2002; Möckel et al., 2001). Plusieurs hypothèses concernant ces variations ont été émises : 1) l'élévation des contraintes de cisaillement s'effectuant sur l'endothélium lors d'une augmentation du débit cardiaque va entraîner le clivage des molécules d'adhérence exposées à la surface de l'endothélium qui se retrouvent alors libres dans la circulation

sanguine (Marsh and Coombes, 2005) ; 2) l'augmentation modeste et transitoire du TNF- α lors d'exercices vigoureux pourrait induire la synthèse et la sécrétion de ces molécules d'adhérence (Shephard, 2003) ; 3) la réponse à l'exercice aigu médiée par les catécholamines conduirait à l'activation de la voie de signalisation de l'AMP cyclique pourrait être un autre mécanisme stimulant la libération de molécules d'adhérence solubles (Shephard, 2003).

c. Exercice aigu, stress oxydant et capacité antioxydante

Comme précédemment décrit, toute situation dans laquelle la consommation en oxygène augmente est susceptible de générer une production accrue de ROS. Pour cette raison, l'exercice aigu constitue une importante source de production de stress oxydant (Figure 26) (Vollaard et al., 2005). Les mécanismes sous-jacents sont globalement les mêmes que ceux décrits dans II.B.1.b. Au cours de l'exercice, la suractivité de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la NADPH oxydase due à des besoins en ATP accrus ainsi que l'activation de la xanthine oxydase suite à des épisodes d'I/R localisés génèrent une surproduction de ROS. Le stress mécanique subi par les fibres musculaires au cours de l'effort induit des microlésions amorçant des processus inflammatoires et oxydants en post-exercice (Bloomer and Goldfarb, 2004).

➤ *Marqueurs de peroxydation lipidique* : dans la plupart des études, une hausse des TBARS est visible lors d'exercices aérobies concentriques sous-maximaux (Alessio et al., 1997; Børsheim et al., 1999; Nikolaidis et al., 2007), maximaux (Michailidis et al., 2007; Miyazaki et al., 2001; Steinberg et al., 2007) et lors d'exercices aérobies excentriques (Maughan et al., 1989). Ces résultats sont contrastés par d'autres études montrant une absence de changements de concentration en TBARS malgré des protocoles d'exercices semblables (Goldfarb et al., 2005; Laires et al., 1993). Ces différences pourraient s'expliquer par un manque de spécificité du dosage des TBARS causé par une interférence d'autres molécules biologiques avec le TBA (Fisher-Wellman and Bloomer, 2009). Les F₂-isoprostanes augmentent également au cours

d'exercices concentriques sous-maximaux (Goto et al., 2007; Waring et al., 2003) et excentriques (Sacheck et al., 2003; Sacheck et al., 2006). Là encore, quelques études nuancent ces données en montrant une absence de variations des isoprostanes (Rush and Sandiford, 2003; Watson et al., 2005). Cependant, dans l'étude de Watson *et al.*, les sujets étaient entraînés et seraient moins sensibles aux attaques oxydantes grâce à un système de défenses plus efficace (discuté dans III.B.1.b). Dans celle de Rush et Sandiford, l'intensité d'exercice utilisée était relativement faible (50% $\dot{V}O_2\text{max}$) suggérant un effet intensité-dépendant de l'exercice sur les concentrations en isoprostanes (Fisher-Wellman and Bloomer, 2009).

➤ *Marqueurs d'oxydation protéique* : Une oxydation des protéines suite à un exercice aigu a largement été décrite dans la littérature (Bloomer et al., 2006; Goldfarb et al., 2005; Goldfarb et al., 2007; Michailidis et al., 2007; Nikolaidis et al., 2007). La totalité des études contredisant cet effet (Gaeini et al., 2006; Miyazaki et al., 2001; Rahnema et al., 2007) a utilisé un protocole d'exercice très court et n'a observé aucun changement de concentration en protéines carbonylées suggérant un effet de la durée de l'exercice sur l'oxydation protéique (Fisher-Wellman and Bloomer, 2009).

➤ *Marqueur d'oxydation de l'ADN* : La majorité des études rapporte une absence de variations des concentrations en 8-OHdG, marqueur d'oxydation nucléaire (Bloomer et al., 2005; Bloomer et al., 2006; Sumida et al., 1997a; Sumida et al., 1997b; Viguie et al., 1993). Ceci s'expliquerait par une restauration rapide de l'ADN après des attaques oxydantes due à une activité exacerbée d'enzymes de réparation de l'ADN mesurée en réponse à un exercice aigu (Radák et al., 2003).

En réponse à un effort physique aigu et intense, les capacités antioxydantes d'un individu ont tendance à décroître temporairement pour faire face aux attaques oxydantes massives (Figure 26). La capacité antioxydante totale est généralement diminuée pendant et immédiatement après l'exercice (Di Massimo et al., 2004; Steinberg et al., 2006; Tozzi-Ciancarelli et al., 2002; Watson et al., 2005) puis augmente à nouveau à des valeurs supérieures à celles de repos (Steinberg et al.,

2006; Watson et al., 2005). Lorsqu'on s'intéresse spécifiquement à l'activité/concentration des principales enzymes antioxydantes, les études divergent nettement plus. Alors que certains détectent des activités de GPx et SOD diminuées (Akova et al., 2001; Tozzi-Ciancarelli et al., 2002), d'autres montrent une augmentation de l'activité de ces enzymes (Buczynski et al., 1991; Elosua et al., 2003), et d'autres encore n'observent aucune différence dans l'activité de GPx, SOD et catalase (Miyazaki et al., 2001; Tauler et al., 2006). Les raisons pouvant expliquer l'hétérogénéité de ces observations sont le compartiment étudié (plasma, érythrocytes ou plaquettes), la durée et l'intensité de l'exercice effectué ainsi que le moment du prélèvement qui varient considérablement entre les études (Fisher-Wellman and Bloomer, 2009).

d. Modulation du tonus vasomoteur par l'exercice aigu

Une élévation des contraintes de cisaillement appliquées sur la paroi des vaisseaux sanguins entraîne une augmentation de la production de NO et de l'activité d'eNOS (Figure 28) (Di Francescomarino et al., 2009; Fleming and Busse, 2003; Kojda and Hambrecht, 2005). Or en réponse à l'exercice aigu, le débit sanguin est précisément ajusté au fonctionnement adéquat de chaque organe ; il augmente donc au niveau du cœur et des muscles et diminue au niveau des reins notamment (Marieb, 2005). Ces adaptations particulières semblent être reflétées par la modulation de la biodisponibilité du NO dans ces organes. Ainsi Bernstein *et al.* observent une hausse de la production de NOx (nitrite/nitrate), produits dérivés du métabolisme du NO, dans le système coronarien de chiens en réponse à un exercice aigu (Bernstein et al., 1996). Dans les muscles squelettiques, l'activité de la NOS augmente au cours de contractions *ex vivo* dans l'EDL chez la souris (Merry et al., 2010), de contractions *in situ* dans le complexe gastrocnemius-plantaris-soleus chez le rat (Ross et al., 2007) et au cours d'un exercice aigu dans le muscle gastrocnemius de rat (Roberts et al., 1999) et le vastus lateralis chez l'Homme (Linden et al., 2011). A l'inverse, Maeda *et al.* rapportent une baisse de l'expression, de l'activité d'eNOS et de la concentration en NOx, produits dérivés du NO chez des rats ayant effectué un

exercice sous-maximal de 30min sur tapis roulant (Maeda et al., 2004), baisses qui sont tout de même en accord avec la diminution du flux sanguin rénal au cours de l'exercice. Malgré tout, la durée et l'intensité de l'exercice jouent un rôle qualitatif et quantitatif important sur la bioactivité du NO (Green et al., 2004). Effectivement, un exercice sur bicyclette ergométrique constituerait un stimulus plus efficace dans la production de NO endothélial au niveau de lit vasculaire de l'avant-bras qu'un exercice de type « handgrip » (Green et al., 2005). De plus, la forte synthèse de ROS lors d'un exercice intense serait susceptible d'altérer la biodisponibilité du NO en le piégeant pour former du ONOO⁻, contrairement à un exercice à intensité modérée voire faible (Di Francescomarino et al., 2009).

2. Effets de l'exercice aigu chez des porteurs d'hémoglobine S

a. Réponses aiguës à un exercice chez des porteurs du trait drépanocytaire

Être porteur du trait drépanocytaire ne constitue pas, *a priori*, une contre-indication à la pratique sportive. Une vaste étude épidémiologique réalisée en Côte d'Ivoire, entre 1956 et 1995 a même montré que le pourcentage de champions PTD (27.8%) en saut et lancer était supérieur au pourcentage que représente les PTD (12%) dans la population générale suggérant que le trait drépanocytaire pouvait conférer un avantage lors d'exercices d'athlétisme à prédominance anaérobie (Bilé et al., 1998). Dans cette étude, les auteurs dénombrent également des pourcentages élevés de « recordmans » PTD, en saut en hauteur chez les femmes (91% étaient PTD) et en lancer de poids chez les hommes (87,5% étaient PTD). Des proportions non négligeables de PTD ont aussi été rapportées lors d'événements sportifs à composante aérobie (Le Gallais et al., 1994; Thiriet et al., 1994). Néanmoins des cas de rhabdomyolyse et même de mort subite de sujets PTD suite à un exercice extrêmement intense sont relatés dans la littérature (Anzalone et al., 2010; Connes, 2015; Eichner, 2010; Harris et al., 2012; Jones et al., 1970; Pretzlaff, 2002; Ridha et al., 2014; Rosenthal and Parker, 1992). Les premiers cas décrits sont quatre recrues de l'armée américaine, décédées après une session d'entraînement particulièrement

intense et réalisée en altitude qui ont été génotypées A/S *post-mortem* (Jones et al., 1970). Les autopsies révèlent des congestions généralisées avec présence de cellules falciformes. Entre 1974 et 2000, le trait drépanocytaire aurait été associé à la mort de 10 joueurs de football américain universitaire et 3 autres recrues de l'armée (Mitchell, 2007). La NCAA (National Collegiate Athletic Association) fait état de 7 décès de joueurs de football américain PTD au niveau universitaire entre 2000 et 2009. Même s'il est maintenant établi que ces morts subites se produisent majoritairement lors des sessions d'entraînement de la pré-saison lorsque les athlètes sont « désentraînés », les facteurs déclencheurs de ces événements demeurent mal compris (Eichner, 2010). Malgré tout, certaines conditions environnementales/physiques comme la forte chaleur, l'altitude, la déshydratation et une intensité d'exercice extrêmement forte augmenteraient considérablement le risque de collapsus chez les PTD (Connes et al., 2008; Eichner, 2010). C'est pourquoi récemment, la NCAA et l'ACSM (American College of Sports Medicine) ont publié un consensus sur le trait drépanocytaire et l'exercice incluant quelques recommandations qui comprennent une acclimatation progressive à la chaleur, l'humidité et l'altitude ; une reprise progressive des exercices à forte intensité lors de l'entraînement en début de saison ; un arrêt immédiat de l'exercice dès les premiers signes de détresse physique (ACSM and NCAA Joint Statement on Sickle Cell Trait and Exercise, 2013).

Diverses pistes concernant les mécanismes physiopathologiques pouvant être à l'origine des complications observées chez les PTD ont été explorées. Les PTD sont caractérisés par un remodelage du réseau microcirculatoire musculaire (Vincent et al., 2010). Ce remodelage, caractérisé par une moindre densité capillaire, une tortuosité réduite et un diamètre capillaire moyen plus large, serait une réponse adaptative à une viscosité anormalement élevée et à une déformabilité érythrocytaire limitée aussi bien au repos qu'en réponse à l'exercice (Connes et al., 2006; Monchanin et al., 2005). Les PTD affichent également une activation endothéliale en réponse à un exercice

intense. Monchanin *et al.* mesurent des concentrations en sVCAM-1 supérieures chez des athlètes PTD comparés à des athlètes non PTD après un exercice incrémental exhaustif (Monchanin *et al.*, 2007). Dans une autre étude, l'augmentation en sVCAM-1 n'est pas retrouvée chez des PTD en réponse à 3 exercices incrémentaux successifs (Tripette *et al.*, 2010b). Les auteurs détectent en revanche des taux de sL-sélectine et sP-sélectine supérieurs chez les PTD par rapport aux porteurs d'une HbA après la répétition d'exercices. Ainsi l'élévation des concentrations plasmatiques en molécules d'adhérence pourraient présenter un risque d'altération de la microcirculation et contribuer au déclenchement des complications liées à un exercice très intense (Martin *et al.*, 2015). Néanmoins, le manque de données disponibles ne permet pas une compréhension claire de l'importance de ces mécanismes d'adhérence vasculaire dans l'apparition des complications chez les PTD (Tripette *et al.*, 2013). De légères variations du stress oxydant et de biodisponibilité du NO sont mesurables chez les PTD par rapport aux porteurs d'HbA en réponse à l'exercice aigu. Das *et al.* montrent une plus forte susceptibilité des érythrocytes à l'oxydation lors d'un exercice incrémental associée à une activité GPx réduite chez des PTD (Das *et al.*, 1993). Dans cette même étude, les auteurs détectent une augmentation de l'activité SOD en réponse à l'exercice suggérant une plus forte production d'H₂O₂ qui n'est ensuite pas pris en charge par le défaut d'activité de la GPx et pourrait donc potentiellement accroître la production de ROS chez les PTD. Dans une autre étude, une légère tendance à l'augmentation des TBARS au cours de la récupération et une production réduite de sous-produits du NO 24h après un exercice maximal ont été observées chez des PTD alors qu'ils restaient inchangés chez les sujets contrôles (Tripette *et al.*, 2010a). Une 3^{ème} étude décrit des taux plasmatiques de nitrite/nitrate significativement diminués ainsi qu'une hausse des AOPP chez des PTD immédiatement après un exercice intense (Faës *et al.*, 2012). La phase de récupération était caractérisée par une peroxydation lipidique et une concentration en nitrotyrosine accrues chez les PTD.

Finalement, même si les PTD semblent présenter quelques anomalies vasculaires, il n'est pas encore établi qu'elles sont suffisamment sévères pour déclencher des accidents vaso-occlusifs. Néanmoins, dans des conditions environnementales particulièrement non favorables et dans de rares cas, la répétition de processus pro-oxydants et pro-adhésifs pourrait être à l'origine d'évènements délétères et majorer le risque de survenue des complications associées à l'exercice aigu (Martin et al., 2015).

b. Réponses aiguës à un exercice chez des sujets drépanocytaires homozygotes

Les nombreux changements métaboliques induits par l'exercice aigu ont amené les professionnels de santé à déconseiller la pratique d'une activité sportive à leurs patients drépanocytaires (Connes et al., 2011). L'anémie entraîne une transition plus rapide du métabolisme aérobie vers l'anaérobie lors de l'exercice. Il y a alors une forte production d'acide lactique et, par effet « Bohr » (Figure 9), la désoxygénation de l'HbS est potentialisée ainsi que le risque de polymérisation et d'occlusions microvasculaires (Moheeb et al., 2007). La déshydratation liée à l'exercice a tendance à concentrer l'HbS au sein du GR pouvant contribuer à la falciformation (Platt, 1982). L'exercice provoque également une hypoxie tissulaire qui, chez les S/S, est susceptible d'accroître le risque d'apparition d'évènements vaso-occlusifs (Connes et al., 2011). En plus de ces risques existants, plusieurs études rapportent une intolérance à l'exercice chez les drépanocytaires. En 1994, Millis *et al.* décrivent une altération de la performance lors d'activités physiques courantes (épreuves de nage et de course en sac) chez des enfants atteints de drépanocytose (Millis et al., 1994). L'un des facteurs majeurs limitant l'aptitude physique serait la sévérité de l'anémie en lien avec les anomalies pulmonaires restrictives et la fréquence des crises thoraciques aiguës (Liem et al., 2009). En effet, une étude montre une $\dot{V}O_2$ pic et un seuil anaérobie diminués en réponse à un test cardio-pulmonaire maximal (CPET : Cardio pulmonary Exercise Testing) chez toutes les patientes incluses (Callahan et al., 2002). La plupart affichait en plus, une hausse anormale du gradient alvéolo-artériel et une

incapacité à diminuer le ratio V_D/V_T (V_D : volume mort; V_T : volume courant) à l'exercice suggérant des désordres pulmonaires chez cette sous-population. D'autres ne présentaient pas de problèmes pulmonaires mais une fréquence cardiaque de réserve élevée en réponse à l'exercice maximal. Or, ce paramètre, associé avec une $\dot{V}O_2$ pic et un seuil anaérobie faibles, est généralement signe d'anomalies vasculaires périphériques (Callahan et al., 2002). Dans leur étude, Moheeb *et al.* ont étudié les réponses physiologiques à des exercices isotoniques et isométriques chez des enfants drépanocytaires (Moheeb et al., 2007). Leurs mesures de force et de puissance anaérobie étaient significativement réduites par rapport aux enfants porteurs d'HbA ou du trait drépanocyttaire. Les sujets ont également participé à un exercice de course sur tapis roulant pendant 5min au cours duquel la fréquence cardiaque (FC) des enfants malades était significativement supérieure à celle des enfants asymptomatiques. Les auteurs en concluent un effet compensatoire de la FC sur les capacités réduites de transport de l'oxygène dues à l'anémie et aux altérations microcirculatoires (Moheeb et al., 2007). Ainsi, malgré les aptitudes aérobies limitées des patients S/S, les tests de tolérance à l'exercice peuvent fournir d'importantes informations sur des problèmes médicaux pernicious non diagnostiqués en conditions de repos (Connes et al., 2011). Parmi ces tests, le plus utilisé est le test de marche de 6 minutes, validé par l'ATS (« American Thoracic Society »), consistant à réaliser une marche de 6min sur la plus longue distance possible (ATS Statement, 2002). Ce test sert notamment d'indice de la fonction cardio-pulmonaire et d'hypertension artérielle pulmonaire chez les patients drépanocytaires (Alameri et al., 2008; Anthi et al., 2007; Delclaux et al., 2005; Halphen et al., 2014) et est aussi utilisé afin d'évaluer les potentiels effets bénéfiques d'un agent pharmacologique à visée thérapeutique chez ces malades (Barst et al., 2010; Machado et al., 2005; Minniti et al., 2009).

Malgré une aptitude aérobie réduite chez les patients drépanocytaires, des études récentes rapportent une absence de complications liées à la maladie lors de

séances d'exercices aigus sous-maximaux. Une étude portant sur un exercice de pédalage de 20min réalisé en position couchée à environ 50% de leur puissance pic révèle une absence d'altération des paramètres hématologiques et hémorhéologiques chez des patients S/S en réponse à l'exercice (Balayssac-Siransy et al., 2011). Seul le pourcentage de cellules denses a augmenté en réponse à l'exercice chez ces malades. Ces cellules rigides, sont très sensibles à l'hémolyse intravasculaire mais peu adhésives (Kaul and Nagel, 1993) limitant leur risque d'adhérer à l'endothélium. Cependant, aucune complication clinique n'a été déplorée lors de l'exercice et pendant la phase de récupération (Balayssac-Siransy et al., 2011). Les patients ne se sont plaints d'aucune difficulté lors de la réalisation de l'effort ce qui a permis aux auteurs de conclure qu'un exercice d'intensité modérée ne semble pas préjudiciable pour ces malades. Waltz *et al.* étayent ces observations en montrant une diminution du seuil de désagrégation érythrocytaire dans les 36 et 60 h suivant un exercice incrémental stoppé à l'atteinte du premier seuil ventilatoire (SV_1) (Waltz et al., 2012). Les auteurs concluent alors à un effet retardé mais potentiellement bénéfique d'un exercice modéré sur le flux sanguin microcirculatoire puisque les GRs seraient capables de se désagréger à de plus faibles vitesses de cisaillement. En parallèle, Faes *et al.*, ont mesuré des marqueurs de l'inflammation, du stress oxydant et du métabolisme du NO sur la même cohorte de patients que Balayssac *et al.* (2011) (Faes et al., 2014). Aucun changement dans les concentrations plasmatiques de sP-sélectine et sE-sélectine n'a été détecté tandis que sVCAM-1 et sICAM-1 étaient plus concentrés après l'exercice de 20 minutes. La concentration en MDA augmentait avec l'exercice chez les sujets sains et les patients drépanocytaires alors que les autres marqueurs du stress oxydant (AOPP, FRAP : Ferric reducing antioxidant power, GPx, SOD, catalase) n'évoluaient pas avec l'exercice (Faes et al., 2014). Bien que les taux de NOx (Nitrite/Nitrate) fussent inférieurs chez les patients S/S, ils sont restés inchangés après l'exercice dans les deux groupes. Sachant que les patients drépanocytaires n'ont affiché aucune complication clinique au cours et après la réalisation de l'exercice, les auteurs concluent qu'un exercice d'intensité modérée de courte durée

semble sans danger pour les patients mais émettent des réserves à cause de l'augmentation de certains marqueurs d'activation endothéliale et du stress oxydant qui risqueraient d'aggraver la dysfonction endothéliale et la survenue de CVOs. Très récemment, Liem *et al.* montrent dans une population pédiatrique drépanocytaire que malgré des concentrations basales en cytokines pro-inflammatoires et molécules d'adhérence supérieures par rapport à des sujets contrôles, un exercice maximal symptôme-limitant (CPET) n'aboutit pas à une augmentation exacerbée de l'activation endothéliale ni de l'inflammation chez les malades (Liem *et al.*, 2015b). Le fait que l'exercice maximal n'ait, de surcroît, eu aucun effet secondaire indésirable chez les enfants drépanocytaires fournit des arguments préliminaires de l'innocuité d'un exercice physique intense et bref stoppé dès l'apparition des premiers signes d'inconfort ou de douleur.

Sur la base des études précédentes, il ne semble pas impératif de proscrire la pratique d'un exercice chez les S/S ; cependant cette pratique nécessite la prise en compte de considérations importantes. Les sports de contact devraient être évités surtout chez les patients présentant une splénomégalie étant donné le fort risque de rupture de la rate (Jama *et al.*, 2002). Les malades devraient débiter l'exercice progressivement et s'arrêter aux premiers signes de fatigue (Connes *et al.*, 2011) afin de ne pas avoir à faire face à de potentiels effets délétères de l'exercice comme une surproduction de lactate par exemple. D'ailleurs, comme l'ont suggéré les études de Balayssac *et al.* (2011) et de Waltz *et al.* (2012), l'intensité d'exercice ne devrait pas excéder le seuil anaérobie qui se trouve entre 35 et 60% de $\dot{V}O_2\text{max}$ chez les patients drépanocytaires (Anthi *et al.*, 2007; Callahan *et al.*, 2002). Enfin, la durée de l'effort ne devrait pas dépasser 20 minutes sans phase de récupération et des mesures particulières doivent être prises lors de la pratique en extérieur pour éviter la déshydratation qui peut s'avérer être rapidement dommageable pour les patients (Connes *et al.*, 2011).

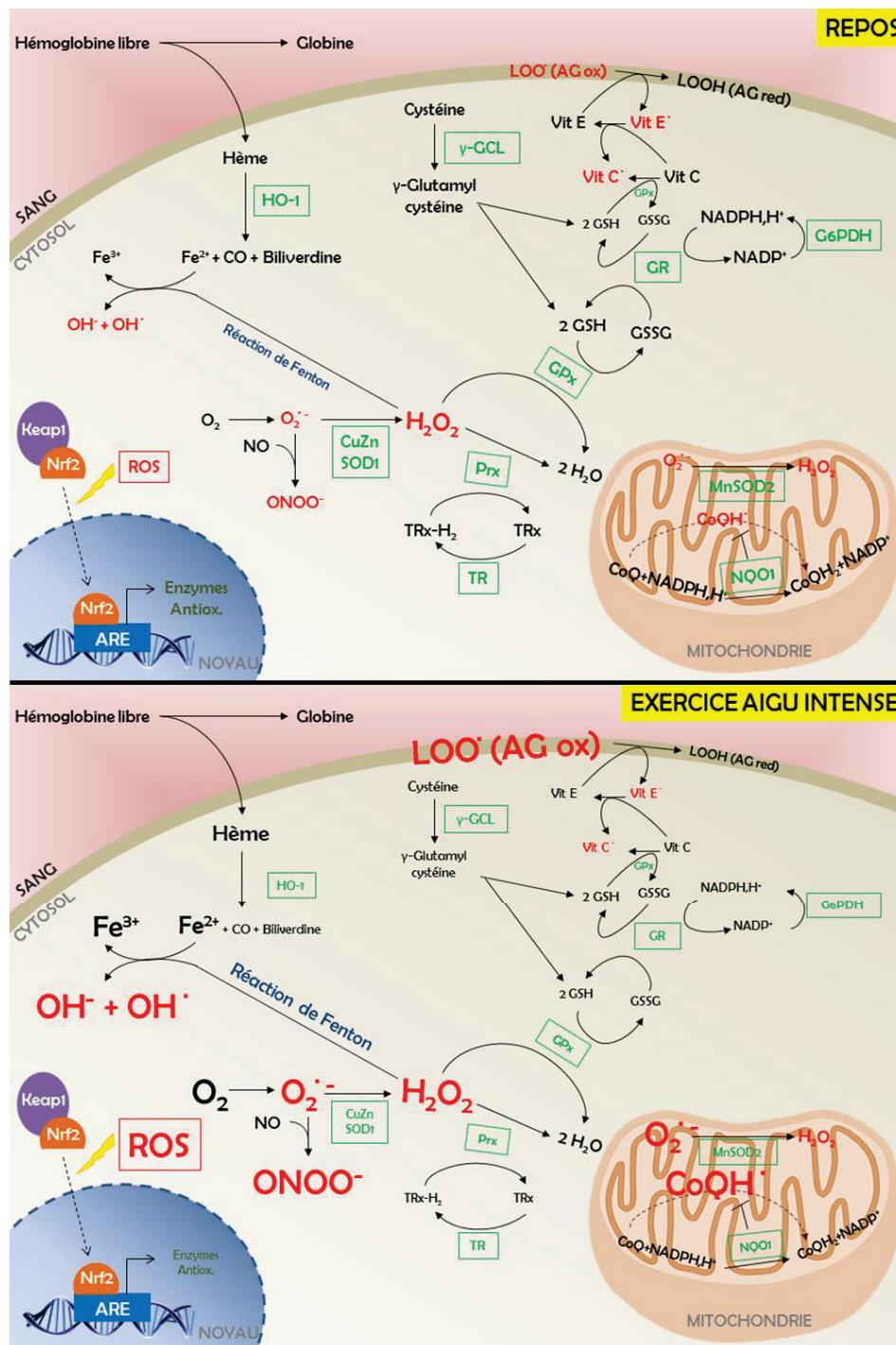


Figure 26. Balance pro/antioxydants au repos vs. à l'exercice aigu.

A l'exercice aigu, il y a mise en place d'un stress oxydant via une surproduction de ROS (en rouge). En vert, sont représentées les enzymes antioxydantes. **Fe³⁺** : ion ferrique ; **Fe²⁺** : ion ferreux ; **CO** : Monoxyde de carbone ; **HO-1** : Hème oxygénase-1 ; **γ-GCL** : γ-glutamyl cystéine ligase ; **LOO[•]** : Acide gras (AG) peroxydé ; **LOOH** : AG réduit ; **Vit E[•]** : Vitamine E réactive ; **Vit C[•]** : Vitamine C réactive ; **GPx** : Glutathion peroxydase ; **GSH** : Glutathion réduit ; **GSSG** : Glutathion oxydé ; **G6PD** : Glucose 6-phosphate déshydrogénase ; **GSR** : Glutathion réductase ; **Keap1** : Kelch-like ECH-associated protein-1 ; **Nrf2** : Nuclear factor erythroid-related factor-2 ; **ARE** : Antioxidant response element ; **O₂^{-•}** : anion superoxyde ; **ONOO⁻** : péroxynitrite ; **H₂O₂** : peroxyde d'hydrogène ; **Prx** : Peroxyredoxine ; **TRx-H₂** : Thioredoxine réduite ; **TRx** : Thioredoxine oxydée ; **TR** : Thioredoxine réductase ; **CoQ** : Coenzyme Q ; **CoQH[•]** : radical Coenzyme Q ; **CoQH₂** : Coenzyme Q réduit.

B. RÉPONSES PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES À UN EXERCICE PHYSIQUE RÉGULIER

L'inactivité physique est un facteur de risque connu pour participer au développement de nombreuses maladies chroniques (Booth et al., 2012). A travers le monde, 30% des adultes et 80% des adolescents n'atteignent pas les recommandations journalières de l'OMS en matière d'activité physique (Hallal et al., 2012). Il est pourtant admis que la pratique régulière d'une activité physique contribue grandement à la prévention, à la gestion et même au traitement d'une multitude de désordres chroniques incluant notamment l'hypertension (Ketelhut et al., 2004; Mereles et al., 2006), les maladies coronariennes (Hambrecht et al., 2003; Taylor et al., 2004), l'obésité (Hill and Peters, 1998; Karlsson et al., 2007), le diabète de type 2 (Boulé et al., 2003; Teixeira-Lemos et al., 2011) etc...

1. Adaptations physiologiques à l'exercice physique chronique

L'exercice chronique ou entraînement se définit par la répétition de séances d'exercice maintenues dans le temps. Il représente un stimulus puissant qui aboutit à d'importantes adaptations physiologiques sur les fonctions musculaire, cardiopulmonaire et vasculaire notamment.

a. Effets chroniques de l'exercice sur les variables hématologiques et hémorhéologiques

Comme précisé dans le paragraphe III.A.1.a., un exercice aigu entraîne une hémococoncentration alors que la période de récupération suivant cet exercice est, en général, associée à une hémodilution persistant plusieurs heures voire plusieurs jours (Gillen et al., 1991; Irving et al., 1990; Kargotich et al., 1998). Il s'avère même que plus la perte de volume plasmatique au cours de l'exercice est forte, plus l'hémodilution post-exercice est importante (Fellmann, 1992). Cette hémodilution est principalement due à une augmentation du volume plasmatique et non à une hémolyse. Elle persiste après un entraînement expliquant la baisse de l'hématocrite et celle de la viscosité sanguine communément mesurées chez des sujets entraînés (Brun, 2002; Ernst, 1987;

Fellmann, 1992; Romain et al., 2011). Cette adaptation particulière semble, *a priori*, paradoxale puisque la performance sportive dépend beaucoup de la capacité de transport de l'oxygène aux muscles actifs. Or il existe une forte corrélation positive entre le volume sanguin et l'aptitude physique (Convertino, 1991) ainsi qu'une corrélation négative entre l'hématocrite et l'aptitude physique de sujets entraînés (Brun et al., 1989; Brun et al., 2000). Ainsi hémodilution et hypervolémie auraient comme conséquences physiologiques une réduction des résistances périphériques au niveau vasculaire et un meilleur retour veineux qui, par la loi de Frank-Starling, augmentent le volume d'éjection systolique et diminuent la fréquence cardiaque (Brun et al., 2000; Convertino, 1991). L'hypervolémie permettrait également d'optimiser la thermorégulation à l'exercice en augmentant le volume de fluide disponible pour les glandes sudoripares et la surface d'échanges cutanée pour le transfert de chaleur par évaporation et convection (Convertino, 1991). L'exercice chronique a, de surcroît, été rapporté pour diminuer le pourcentage de GRs denses et d'augmenter le VGM (Volume Globulaire Moyen) sans altérer la masse érythrocytaire suggérant un recyclage accéléré des GRs sénescents (Green et al., 1991; Mairbaurl et al., 1983). Or les jeunes GRs ont été montré pour être plus déformables que les vieux GRs denses (Sutera et al., 1985) ce qui expliquerait la meilleure déformabilité des GRs mesurée chez des athlètes comparés à des sujets sédentaires (Ernst, 1987). L'augmentation de la fluidité membranaire érythrocytaire optimiserait la diffusion de l'oxygène aux muscles actifs (Smith, 1995).

b. Exercice chronique, inflammation et adhérence vasculaire

Les données de la littérature concernant l'évolution des marqueurs de l'inflammation et d'adhérence vasculaire avec l'entraînement physique ne sont pas uniformes au sein de populations de sujets sains. Certains auteurs font état d'une absence de variations (ou bien d'une très légère variation sans signification cliniquement pertinente) du nombre de leucocytes (Gleeson, 2007; Mackinnon, 1997) et des concentrations plasmatiques en CRP (Camhi et al., 2010; Campbell et al., 2008), en IL-1 β , IL-6 et TNF- α (Stewart et al., 2007) entre des sujets entraînés et non

entraînés. D'autres montrent généralement une baisse de ces paramètres avec l'entraînement. Ainsi, sur une large cohorte grecque, Panagiotakos *et al.* mesurent un nombre de leucocytes et des taux plasmatiques en CRP, IL-6 et TNF- α plus faibles chez des sujets pratiquant beaucoup d'activités physiques pendant leur temps libre par rapport à des sujets inactifs (Panagiotakos *et al.*, 2005). En 2007, Stewart *et al.* montrent une diminution de la concentration plasmatique en CRP chez des sujets sédentaires ayant suivi un protocole d'entraînement combiné en aérobie et résistance sur 12 semaines (Stewart *et al.*, 2007). De plus, sur un suivi de cohorte de 10 ans, Hamer *et al.* observent des taux plasmatiques en CRP et IL-6 inférieurs chez des sujets physiquement actifs par rapport à ceux pratiquant peu d'activité (Hamer *et al.*, 2012). Enfin, plusieurs études montrent des corrélations négatives entre la concentration plasmatique en CRP (Church *et al.*, 2002; Ford, 2002) ou en IL-6 (Fischer, 2006) et le degré d'activité physique (prenant en compte la durée, l'intensité et la fréquence).

Le constat est le même pour les molécules d'adhérence vasculaire. Alors que plusieurs études ne détectent pas de différences de concentrations en sP-sélectine (Wang *et al.*, 2005), sICAM-1 (Østergård *et al.*, 2006; Sabatier *et al.*, 2008) et sVCAM-1 (Østergård *et al.*, 2006) entre des sujets entraînés (ou physiquement actifs) et des sujets sédentaires, d'autres montrent une corrélation négative entre sE-sélectine ou sICAM-1 et le degré d'activité physique (Demerath *et al.*, 2001; Rohde *et al.*, 1999).

La grande hétérogénéité des données disponibles quant à l'effet d'un exercice chronique sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires et molécules d'adhérence chez des sujets sains pourrait s'expliquer par des concentrations basales déjà faibles chez ces derniers. Les taux réduits en début de protocole d'entraînement justifieraient donc de l'incapacité de la plupart des études à détecter des variations significatives en post-entraînement.

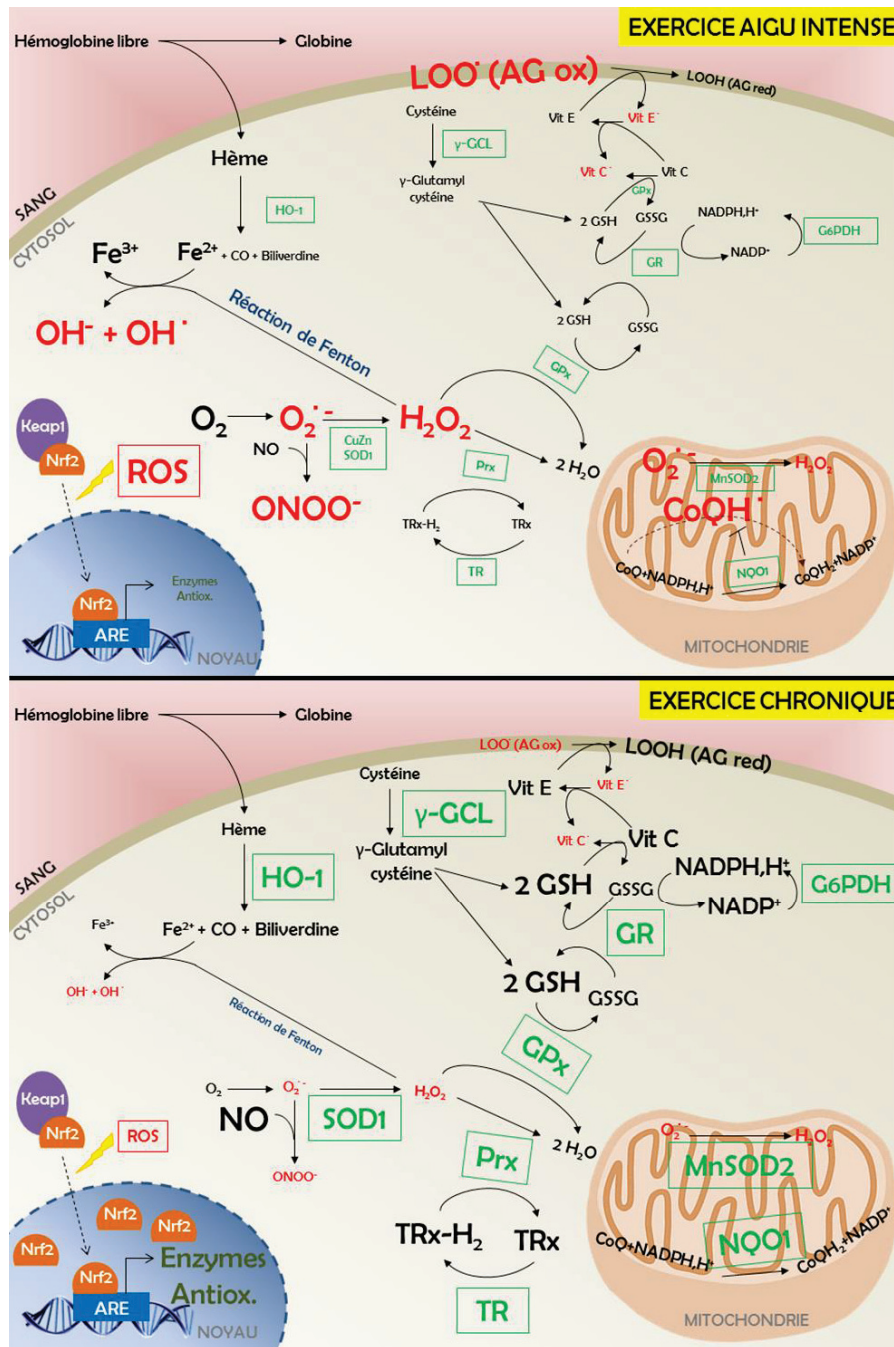


Figure 27. Balance pro/antioxydants à l'exercice aigu vs. à l'exercice chronique.

L'exposition répétée à une surproduction de ROS (en rouge) caractéristique d'un exercice aigu stimule l'expression d'enzymes antioxydantes (en vert). **Fe³⁺** : ion ferrique ; **Fe²⁺** : ion ferreux ; **CO** : Monoxyde de carbone ; **HO-1** : Hème oxygénase-1 ; **γ-GCL** : γ-glutamyl cystéine ligase ; **LOO[·]** : Acide gras (AG) peroxydé ; **LOOH** : AG réduit ; **Vit E[·]** : Vitamine E réactive ; **Vit C[·]** : Vitamine C réactive ; **GPx** : Glutathion peroxydase ; **GSH** : Glutathion réduit ; **GSSG** : Glutathion oxydé ; **G6PDH** : Glucose 6-phosphate déshydrogénase ; **GSR** : Glutathion réductase ; **Keap1** : Kelch-like ECH-associated protein-1 ; **Nrf2** : Nuclear factor erythroid-related factor-2 ; **ARE** : Antioxidant response element ; **O₂^{-·}** : anion superoxyde ; **ONOO⁻** : péronitrite ; **H₂O₂** : peroxyde d'hydrogène ; **Prx** : Peroxyredoxine ; **TRx-H₂** : Thioredoxine réduit ; **TRx** : Thioredoxine oxydé ; **TR** : Thioredoxine réductase ; **CoQ** : Coenzyme Q ; **CoQH[·]** : radical Coenzyme Q réduit ; **CoQH₂** : Coenzyme Q réduit.

c. Influence de l'exercice chronique sur le stress oxydant

Des nombreuses études (décrites en III.A.1.c.) ont établi que l'exercice aigu impose un stress physique qui génère un déséquilibre de la balance oxydative en faveur d'une production de ROS (Fisher-Wellman and Bloomer, 2009). Cependant, sur le long terme, une exposition répétée à un niveau modéré de stress oxydant conduirait à des adaptations physiologiques favorables pour la santé générale (Figure 27). Ce phénomène se base sur le principe d'hormèse désignant une réponse de stimulation des défenses biologiques à des expositions répétées de faibles doses d'agents générateurs de stress, alors qu'à fortes doses la réponse est inhibitrice (Gomez-Cabrera et al., 2008). De ce fait, même si l'augmentation en produits de peroxydation lipidique observée chez des sujets entraînés (Balakrishnan and Anuradha, 1998; Falone et al., 2010; Gougoura et al., 2007; Santos-Silva et al., 2001) paraît, *a priori*, délétère, elle serait nécessaire pour stimuler les défenses antioxydantes et donc promouvoir les effets bénéfiques d'un exercice chronique (Fisher-Wellman and Bloomer, 2009). Une multitude de travaux corrobore cette assertion via des mesures d'activité d'enzymes antioxydantes aussi bien sur des modèles animaux que chez l'Homme. Ainsi, l'activité de la SOD totale est généralement potentialisée par l'entraînement dans les muscles oxydatifs (*e.g.* soleus) (Criswell et al., 1993; Higuchi et al., 1985; Pinho et al., 2006; Powers et al., 1994), mixtes (*e.g.* gastrocnemius, vastus lateralis) et glycolytiques (*e.g.* quadriceps) ainsi que dans les érythrocytes (Balakrishnan and Anuradha, 1998; Djordjevic et al., 2011; Elosua et al., 2003). Comme l'ont montré Higuchi *et al.* et Majerczak *et al.*, cette hausse de l'activité globale de la SOD avec l'entraînement serait essentiellement due à la SOD d'origine mitochondriale (SOD2 ou MnSOD) et non à la SOD cytosolique (SOD1, Cu/ZnSOD), supportée par le fait que la mitochondrie est le siège majeur de production de ROS (Higuchi et al., 1985; Majerczak et al., 2010). De façon similaire, une activité supérieure de GPx a été observée dans les muscles soleus (Criswell et al., 1993) et gastrocnemius (Powers et al., 1994) de rats entraînés sur tapis roulant et dans le plasma humain après 16 semaines d'entraînement aérobie sur ergocycle

(Elosua et al., 2003). De plus, dans une étude épidémiologique transversale, Covas et collaborateurs montrent une association entre l'activité physique et l'activité érythrocytaire de SOD ou GPx (Covas et al., 2002). Les mécanismes moléculaires à l'origine de la stimulation de ces enzymes impliqueraient notamment NF- κ B (Gomez-Cabrera et al., 2008). Dans leur étude, Ji *et al.* proposent que les ROS produits au cours de chaque séance d'exercice activent spécifiquement la voie de signalisation du NF- κ B dont l'expression musculaire est maximale entre 2h et 4h post-exercice puis diminue de nouveau dans les 48h post-exercice chez des rats soumis à un exercice incrémental exhaustif (Ji et al., 2004). Par la suite, la même équipe complète les observations précédentes en rapportant une activation de la voie des MAPK en réponse à l'exercice qui activerait le NF- κ B stimulant à son tour la transcription de la MnSOD et de GPx qui disposent d'un site de liaison à celui-ci dans la région promotrice de leur gènes (Gomez-Cabrera et al., 2005; Gomez-Cabrera et al., 2008). En 2009, George *et al.* complètent ces données en montrant une élévation concomitante de NF- κ B et du facteur cytoprotecteur Nrf2 associée à une activité d'HO-1 et de SOD supérieure ainsi qu'à une diminution du MDA en réponse à 12 semaines d'entraînement sur tapis roulant chez des rats âgés (George et al., 2009). Les auteurs concluent que l'augmentation de deux facteurs NF- κ B et Nrf2 est nécessaire à la stimulation des systèmes antioxydants en réponse à l'entraînement sportif. L'entraînement à intensité modérée a donc un effet protecteur puisqu'il génère suffisamment de stress oxydant pour amorcer l'expression de défenses antioxydantes mais ce stress n'est pas trop important pour causer des dommages cellulaires (Gomez-Cabrera et al., 2008).

d. Adaptation du métabolisme du NO à l'entraînement

Des épisodes réguliers d'augmentation du flux sanguin avec l'entraînement physique améliorent la fonction endothéliale (Figure 28). Le principal mécanisme sous-jacent implique correspond à une production accrue de NO médiée par une augmentation de la production d'eNOS (Di Francescomarino et al., 2009). Néanmoins la durée de l'entraînement physique influencerait sur la modulation de la réponse de

l'endothélium à la hausse du flux sanguin. A la suite d'un entraînement de courte durée, la réponse dilatatrice des vaisseaux est essentiellement médiée par la surproduction du NO tandis qu'un entraînement à long terme conduit à un remodelage structural des artères (Figure 28) (Di Francescomarino et al., 2009). En effet, un entraînement à court terme (2-4 semaines) réalisé chez des rats a montré une synthèse élevée de NO par l'endothélium musculaire accompagnée d'une réponse vasodilatatrice potentialisée par l'acétylcholine mais pas par le nitroprussiate de sodium (SNP). Ceci suggère une réponse endothélium-dépendante et non une hypersensibilité des cellules musculaires lisses au NO suite à l'entraînement (Sun et al., 1994). D'autres études ont décrit une expression protéique d'eNOS augmentée dans l'artère pulmonaire de porcs après un entraînement d'1 semaine (Johnson et al., 2001) et dans l'aorte de rats entraînés pendant 4 semaines (Delp and Laughlin, 1997). Parallèlement, un entraînement de 3-4 semaines améliore la dilatation dépendante du flux sanguin (FMD : Flow-mediated dilation) dans les artères du muscle plantaris de rats mais pas dans les artères mésentériques peu soumises à la hausse des contraintes de cisaillement dues à l'hyperémie lors d'un exercice physique (Sun et al., 1998). Contrairement à des entraînements de courte à moyenne durées, les travaux réalisés sur des entraînements de plusieurs mois ne détectent généralement pas de réponse vasculaire médiée par le NO. Après 16-20 semaines d'entraînement, la vasodilatation dépendante du NO n'était pas modifiée chez des porcs (McAllister et al., 1996) ni chez des rats malgré une meilleure compliance artérielle (Kingwell et al., 1997). L'expression d'eNOS semble également dépendante de la durée de l'entraînement puisqu'aucune modification de cette dernière n'était observée dans l'artère pulmonaire de porcs entraînés pendant 16 semaines (Johnson et al., 2001). Un remodelage des vaisseaux apparaît évident à l'issue d'un entraînement sur une longue période, suggéré par un accroissement du diamètre de l'artère coronaire chez des singes entraînés pendant 1an et demi (Kramsch et al., 1981), chez des rats entraînés pendant 10 semaines (Leon and Bloor, 1968) et chez des chiens entraînés pendant 12 semaines (Wyatt and Mitchell, 1978). Cette adaptation spécifique aurait

pour fonction de contrebalancer les effets des contraintes de cisaillement sur l'endothélium liées à l'exercice permettant au métabolisme du NO de revenir à des niveaux basaux (avant entraînement) (Di Francescomarino et al., 2009).

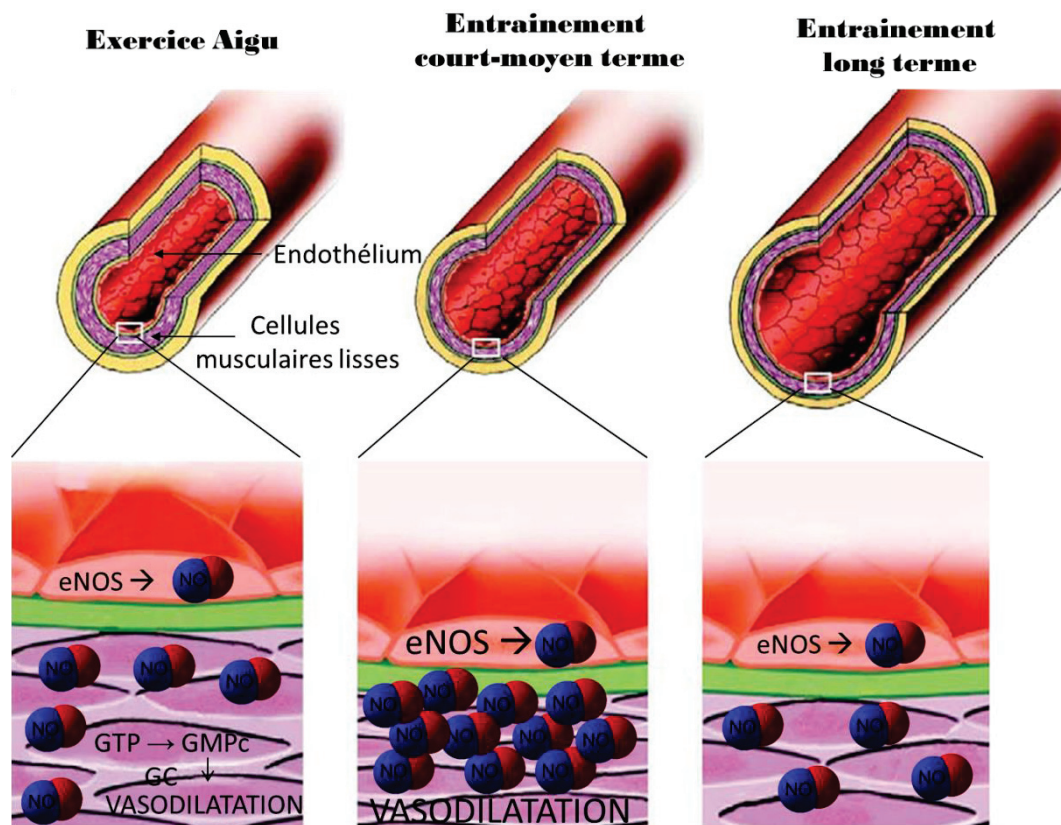


Figure 28. Evolution du métabolisme du NO avec l'entraînement.

L'augmentation des contraintes de cisaillement lors d'un exercice aigu active mécaniquement la NO synthase endothéliale (eNOS) qui produit du NO et entraîne une vasodilatation locale via la voie du GMPc (Guanosine monophosphate cyclique). Lors d'un entraînement à moyen terme, la répétition fréquente de séances d'exercice, exacerbe ce mécanisme. Sur le long terme, il y a un remodelage vasculaire en faveur d'un élargissement des vaisseaux, le mécanisme impliquant le NO est de ce fait moins utilisé. Tiré et adapté de (Di Francescomarino et al., 2009).

2. Adaptations à l'entraînement chez des porteurs d'hémoglobine S

a. Réponses à l'exercice chronique chez les porteurs du trait drépanocytaire

Les effets visiblement fluidifiants de l'entraînement physique sur le sang de sujets sains décrits en III.B.1.a., semblent se retrouver chez les PTD. Récemment, Diaw *et al.* ont montré une baisse d'hématocrite sans modulation du nombre de GRs chez des PTD entraînés régulièrement depuis plus de 3 ans comparés à des sujets PTD ne pratiquant aucune activité sportive (Diaw et al., 2015b). Dans cette cohorte

sénégalaise, l'entraînement avait également pour effet de diminuer les viscosités sanguine et plasmatique à forte vitesse de cisaillement ($225s^{-1}$ et $750s^{-1}$ respectivement) et d'augmenter le ratio hématocrite/viscosité (HVR), indice de l'efficacité du transport de l' O_2 par les érythrocytes (Bogar et al., 2005; Bowers et al., 2008; Connes et al., 2013b; Detterich et al., 2013). De la même façon, dans une étude réalisée au sein de notre laboratoire nous avons observé une baisse de la viscosité sanguine et une hausse du HVR chez des souris SAD après un entraînement volontaire de 8 semaines sur roue d'activité (Faes et al., 2015). Ainsi dans la mesure où une viscosité sanguine élevée est un facteur risque de formation de CVOs (Lamarre et al., 2012), une baisse de cette dernière associée à une augmentation du HVR par l'entraînement pourraient améliorer la perfusion tissulaire, limiter les résistances vasculaires et donc réduire les risques de survenue de complications après un exercice intense.

Alors que les effets positifs de l'entraînement sur l'inflammation sont débattus chez des sujets sains, un grand nombre d'études ont établi le rôle anti-inflammatoire et anti-adhésif de l'exercice chronique dans une multitude de maladies tels que le diabète (Zoppini et al., 2006), le syndrome métabolique (Stensvold et al., 2012), l'obésité (Kawanishi et al., 2010), l'hypertension (Hjelstuen et al., 2006), l'hypercholestérolémie (Yang and Chen, 2003), l'insuffisance cardiaque (Bjørnstad et al., 2008) et rénale (Howden et al., 2012), l'asthme (Pastva et al., 2004). De façon surprenante, ce n'est que récemment que l'impact de l'entraînement sur les processus inflammatoires et pro-adhésifs a été étudié chez les PTD. Ainsi la pratique d'une activité physique régulière limiterait l'activation endothéliale, avec une diminution de sVCAM-1 plasmatique au repos et en réponse à un stress aigu et via une moindre concentration de sE-sélectine et sP-sélectine pendant la récupération (Aufradet et al., 2010). En parallèle, notre équipe a mis en évidence une réduction de l'expression pulmonaire de P-sélectine et de VCAM-1 chez des souris SAD entraînées soumises à un stress d'hypoxie/réoxygénation (Aufradet et al., 2014). Ces données appuient

l'hypothèse d'une réduction du risque de déclenchement d'accidents vaso-occlusifs par l'entraînement physique grâce à une moindre activation endothéliale et une inflammation limitée chez les PTD.

A notre connaissance, une seule étude, réalisée au sein de notre laboratoire, s'est intéressée à l'effet d'un entraînement physique sur le stress oxydant chez des PTD. Chirico *et al.* ont mesuré en réponse à un exercice maximal, un statut pro-oxydant moins important reflété par une diminution des concentrations plasmatiques en AOPP et en protéines carbonylées chez des PTD pratiquant au minimum 8h de football par semaine depuis plusieurs années comparés à des PTD sédentaires (Chirico *et al.*, 2012). L'entraînement régulier a également augmenté l'activité de la SOD en réponse à l'exercice maximal chez ces sujets PTD. L'exercice chronique pourrait ainsi corriger les dommages vasculaires modérés liés à la présence d'HbS chez les hétérozygotes. Cette hypothèse est étayée par une hausse des NOx et une réduction du taux de nitrotyrosine dans le plasma de sujets PTD entraînés en réponse à un exercice maximal (Chirico *et al.*, 2012). Une augmentation de la production du NO après l'entraînement physique améliorerait la fonction vasculaire des PTD.

b. Réponses à l'exercice chronique chez des sujets drépanocytaires homozygotes

Dans le paragraphe précédent, nous avons pu constater que chez les PTD, l'exercice chronique semble réduire l'activation endothéliale, la viscosité sanguine et le stress oxydant et améliorer le métabolisme du NO. Il est donc raisonnable d'émettre l'hypothèse qu'une activité physique régulière aurait des effets bénéfiques semblables chez des patients drépanocytaires homozygotes. Pourtant les inquiétudes des professionnels de santé face à la pratique d'une activité sportive, étant susceptible d'amplifier voire générer des CVOs chez le S/S, ont longtemps restreint le champ d'étude. Jusqu'alors, seules quelques études basées sur des programmes de réhabilitation ont été réalisées. En 1984, Alcorn *et al.* démontrent qu'un traitement

par fluidothérapie¹¹ associé à des activités récréatives de renforcement et d'endurance de 10-30min, réduisait le temps d'hospitalisation d'enfants S/S en état de crise (Alcorn et al., 1984). Plus récemment, une étude de cas a été menée sur une patiente drépanocytaire homozygote de 32 ans souffrant de crises douloureuses fréquentes et intenses et qui a bénéficié d'un programme de réhabilitation physique de 2 séances de 45min d'aquagym par semaine sur 5 semaines (Tinti et al., 2010). A l'issue des 10 sessions, les douleurs éprouvées étaient significativement réduites et ses capacités pulmonaires inspiratoires ainsi que sa qualité de vie générale s'étaient améliorées. De façon regrettable, les bénéfices d'un tel programme n'ont pas été testés sur une plus large cohorte de patients. Au début des années 2000, Barbeau *et al.* sont les premiers et les seuls depuis, à s'intéresser aux paramètres inflammatoires et vasculaires en réponse à l'entraînement chez des patients drépanocytaires homozygotes (Barbeau et al., 2001). Les 3 jours consécutifs d'une 1/2h de course sur tapis roulant à 65-75% de FCmax n'ont pas affecté les marqueurs pro-inflammatoires ET-1, IL-6 et CRP et ont augmenté la concentration en produits finaux du NO chez les patients S/S. L'accumulation de réserves en NO et l'absence de réaction inflammatoire à l'exercice suggèrent alors de moindres risques de formation de CVOs. Ainsi, malgré les résultats prometteurs de ces quelques études quant au rôle protecteur de l'exercice physique régulier, des études complémentaires sont nécessaires avant d'affirmer qu'un entraînement sportif ne présente aucun risque pour la santé des patients drépanocytaires.

¹¹ Immersion d'un membre dans une unité qui produit de la chaleur sèche visant à augmenter la circulation locale et soulager la douleur

IV. INFLUENCE DE LA VOIE DES RÉCEPTEURS AUX AGEs SUR LE STRESS OXYDANT, L'INFLAMMATION ET LA BIODISPONIBILITÉ DU NO DANS LA DRÉPANOCYTOSE

A. MÉCANISMES D'ACTION DE LA VOIE AGE/RAGE

1. Biochimie des AGEs et des RAGEs

a. *La grande variété de produits avancés de la glycation (AGEs)*

Les sucres circulants tels que le glucose, le galactose et le fructose sont capables de réagir de façon non-enzymatique avec les groupements amine des protéines, lipides et acides nucléiques pour générer, à la suite d'une chaîne de réactions complexes, des AGEs (Advanced Glycation End products), produits avancés de la glycation (Ahmed, 2005). Lorsque le groupement carbonyle d'un sucre s'associe avec le groupement amine (des résidus lysine et arginine principalement) d'une protéine, il y a formation d'une base intermédiaire de Schiff qui pourra se réarranger en produit d'Amadori (e.g. fructosamine, hémoglobine glyquée A_{1c}) plus stable, via la réaction de Maillard (Figure 29) (Gkogkolou and Böhm, 2012). Tous deux constituent des produits précoces de la glycation dont la formation est réversible. Les produits d'Amadori ont ensuite plusieurs devenir possibles mais irréversibles : soit donner des α -oxoaldéhydes, intermédiaires carbonylés hautement réactifs, soit donner des AGEs par voie oxydante (e.g. carboxyméthyllysine : CML, pentosidine) ou par voie non-oxydante (e.g. pyrroline) (Singh et al., 2001). Les composés α -oxoaldéhydes que sont le glyoxal, le méthylglyoxal et le 3-désoxy-glucosone, formeront à leur tour des AGEs, par voie non-oxydante le GOLD (glyoxal-lysine dimer), le MOLD (methylglyoxal lysine dimer) et le DOLD (deoxyglucosone-lysine dimer) respectivement ainsi que de la CML et de la pentosidine par voie oxydante (Singh et al., 2001). En plus d'être issus des produits d'Amadori, les intermédiaires α -oxoaldéhydes peuvent être générés par l'auto-oxydation de glucose/bases de Schiff (Basta et al., 2004), suite à la peroxydation lipidique (Ahmed, 2005), ou bien comme sous-produits de la voie des polyols transformant le glucose en sorbitol puis fructose (Singh et al., 2001). Les groupements amines des bases purines -adénine et guanine- de l'ADN peuvent également aboutir à la glycation et formation d'AGEs en réagissant avec des sucres

réactifs intracellulaires (Baynes, 2002). Enfin, les AGEs sont susceptibles d'être produits par association entre un sucre et les groupements amines de phospholipides tels que la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine (Vlassara, 1996).

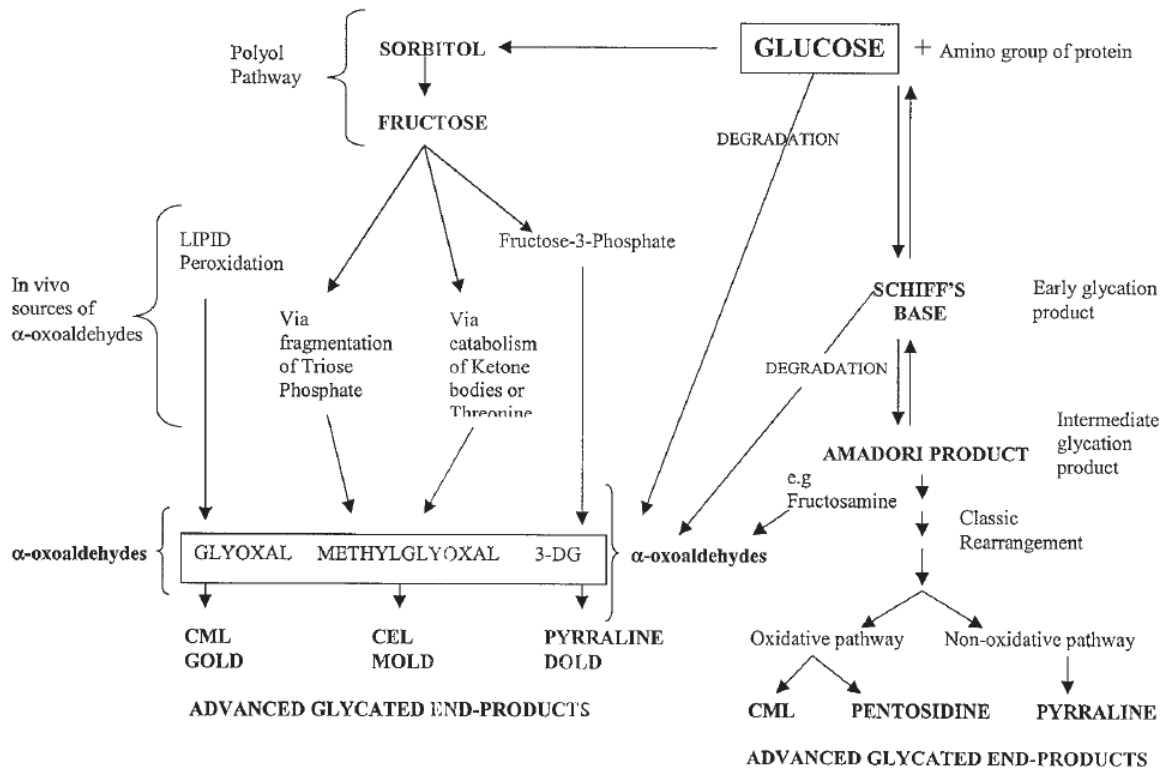


Figure 29. Voies de formation des AGEs.

A partir du glucose, la formation réversible de produits d'Amadori crée des AGEs irréversibles par voie oxydante ou non oxydante. La voie des polyols et la peroxydation lipidique entraînent la formation d'intermédiaires α -oxoaldéhydes (glyoxal, méthylglyoxal et 3-désoxy-glucosone) et qui donnent au final des AGEs. Extrait de (Singh et al., 2001).

b. Le récepteur cellulaire aux AGEs : RAGE

Le récepteur aux AGEs est un ligand protéique transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines. Dans sa forme complète, RAGE contient un domaine N-terminal extracellulaire de type V (variable) qui fixe les ligands, deux domaines extracellulaires de type C (constant), une hélice transmembranaire et un domaine C-terminal cytosolique permettant la signalisation cellulaire (Xie et al., 2013). Il existe deux autres formes tronquées de RAGE provenant d'un épissage alternatif du gène codant pour RAGE (Bierhaus et al., 2005) : le variant 1, sRAGE (soluble RAGE), sans domaine cytosolique et par conséquent sans transduction du signal qui fonctionne alors comme récepteur « leurre » et inhibiteur compétitif de la forme

complète ; le variant 2 sans domaine de type V qui fixe le ligand et serait donc incapable de répondre à un stimulus. Le rôle, *a priori* inutile de ce variant, est sujet à controverse et l'étude d'Hudson (2008) montre même qu'il ne serait pas traduit en protéine mais plutôt dégradé au stade ARNm (Hudson et al., 2008).

2. Expression tissulaire de RAGE et activation par ses ligands

RAGE est hautement conservé entre les espèces puisque la séquence humaine d'acides aminés partage 90% d'homologie avec le bœuf (Neeper et al., 1992) et 78% avec la souris (Kalea et al., 2009) et est exprimé sur une grande variété de types cellulaires (Basta et al., 2004). Via une analyse détaillée en immunohistochimie sur des tissus bovins, Brett *et al.* (1993) décrivent une présence de RAGE sur des cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, phagocytes, hépatocytes, cardiomyocytes, cellules mésangiales rénales et neurones ainsi qu'une forte expression dans l'ensemble du tissu pulmonaire (Brett et al., 1993). L'expression de RAGE peut être régulée par un large panel de ligands (Schmidt et al., 2000) et contrairement à la plupart des récepteurs qui sont régulés négativement lorsque la concentration en ligands augmente, l'interaction ligand-RAGE active d'autant plus l'expression de RAGE (Basta, 2008). Parmi ces ligands, outre les AGEs, on retrouve les membres de la famille des HMGB1 (High Mobility Group Box 1), et plus particulièrement l'amphotérine, classée comme ligand pro-inflammatoire des RAGEs (Basta, 2008). L'amphotérine stabilise la formation du nucléosome et est impliquée dans la régulation de la transcription. Elle est exprimée de façon constitutive mais élevée dans le noyau des cellules de la rate, des cellules endothéliales, des phagocytes et en plus faible quantité dans les hépatocytes et cellules musculaires lisses (Müller et al., 2004). Cette protéine nucléaire pourra être libérée soit passivement par les cellules lésées ou apoptotiques et induire une réponse inflammatoire en se fixant sur le RAGE des cellules immunitaires avoisinantes (Basta, 2008); soit activement par les phagocytes après stimulation par l'interféron- γ ou le TNF- α (Kalinina et al., 2004). Les protéines de la famille des S100/Calgranulines sont également capables d'interagir

avec les RAGEs (Schmidt et al., 2000). Ces protéines de faible poids moléculaire subissent un changement conformationnel lorsqu'elles fixent le calcium, qui crée deux zones symétriques hydrophobes et permet leur interaction avec le domaine C du RAGE (Basta, 2008). Les S100/Calgranulines sont produits de façon endogène par les leucocytes mais peuvent être induits par les cellules musculaires lisses et endothéliales en conditions pathologiques (Bowman and Schmidt, 2011). L'effet pro-inflammatoire des S100/Calgranulines réside notamment dans leur rôle dans l'interaction entre les leucocytes et l'endothélium. Leur libération excessive par les phagocytes au niveau d'un site inflammatoire induit une rétroaction positive facilitant le recrutement de phagocytes supplémentaires (Basta, 2008). L'ensemble de ces ligands sont alors susceptibles d'initier des altérations micro- et macrovasculaires et la grande diversité de type cellulaire exprimant RAGE justifie du rôle physiopathologique essentiel de ces récepteurs dans les vasculopathies.

B. EFFETS INTRACELLULAIRES PHYSIOLOGIQUES DE L'INTERACTION LIGAND-RAGE

1. Le complexe enzymatique NADPH oxydase, carrefour de l'interaction AGE/RAGE et du stress oxydant

L'une des conséquences majeures de l'activation du RAGE est la genèse d'un stress oxydant via la production accrue de ROS, qui augmenterait en retour la formation d'AGEs conduisant à l'expression d'encore plus de RAGEs (Farmer and Kennedy, 2009). Les premiers indices de ce processus ont été démontrés par Yan *et al.* grâce à l'augmentation de la production de MDA et de TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) après infusion d'AGEs, isolés à partir de plasma diabétique sur des cellules endothéliales en culture et des tissus (poumons et foie) de rat (Yan et al., 1994). Un traitement préventif de ces animaux avec des anticorps anti-RAGE ou des antioxydants bloquaient les effets des AGEs infusés. L'implication de la NADPH oxydase dans la voie des AGEs a ensuite été suggérée par Wautier *et al.* en 2001, lorsque dans leur étude, des macrophages issus de souris déficientes pour gp91^{phox},

sous-unité de la NADPH oxydase, étaient incapables de produire du facteur tissulaire (TF) après incubation avec des AGEs alors que des macrophages sauvages en produisaient (Wautier et al., 2001). Par la suite, l'étude de Zhang *et al.* (2006) a confirmé le lien AGE/NADPH oxydase/ROS, en montrant une production exacerbée de ROS, dépendant de la NADPH oxydase dans des cardiomyocytes de rat après stimulation avec de l'albumine glyquée (Zhang et al., 2006). L'activation de la voie AGE/RAGE semble également contribuer à l'amplification du stress oxydant en aval de la NADPH oxydase en réponse à l'induction d'anions superoxyde mitochondriaux (Coughlan et al., 2009). Dans cette étude, une infusion d'AGEs ou une surexpression transitoire des RAGEs ont conduit à une augmentation de la perméabilité mitochondriale et à une déficience du complexe I de la chaîne de transport des électrons dans des cellules rénales de rats sains. Ces deux phénomènes étaient abrogés *in vitro* et *in vivo* après inhibition pharmacologique des AGEs (Coughlan et al., 2009). Les AGEs ont également été décrits comme des accélérateurs des dommages liés à l'ischémie/reperfusion. Des cellules endothéliales cardiaques de rat incubées avec des AGEs avant de subir une ischémie/reperfusion affichaient une augmentation de la libération de LDH, de l'activité caspase, d'iNOS, de la production d'O₂⁻ et une inactivation de la thiorédoxine, molécule cytoprotectrice, par rapport à des cellules sans AGEs et/ou sans I/R (Liu et al., 2011). Les mécanismes de défenses antioxydants semblent donc eux aussi touchés par l'activation de la voie des AGEs. En 1997, Bierhaus *et al.* avaient déjà fait cette observation sur des cellules endothéliales bovines en culture, incubées avec des AGEs chez lesquelles les concentrations en glutathion réduit et acide ascorbique étaient altérées (Bierhaus et al., 1997).

2. L'implication des RAGEs dans l'inflammation et l'adhérence vasculaire

De par sa capacité à reconnaître des structures tertiaires plutôt que des séquences d'acides aminés et étant exprimé dans les tissus et types cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire, RAGE est identifié comme récepteur de

reconnaissance de motifs moléculaires ou PRR (« Pattern Recognition Receptor ») (Chavakis et al., 2004). Cette famille de récepteurs dont font partie, entre autres les TLRs (« Toll-like Receptors »), fixent deux grandes classes de molécules, les motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires, DAMPs (« Damage-associated molecular patterns ») qui englobent notamment les AGEs, HMGB1 et les S100/Calgranulines ; et les motifs moléculaires associés aux pathogènes, PAMPs (« Pathogen-associated molecular patterns »), dont le plus connu est le LPS (lipopolysaccharide). L'association de ces molécules avec un PRR va déclencher une cascade de signalisation aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires et donc à une inflammation aiguë localisée (Figure 30) (Escamilla-Tilch et al., 2013).

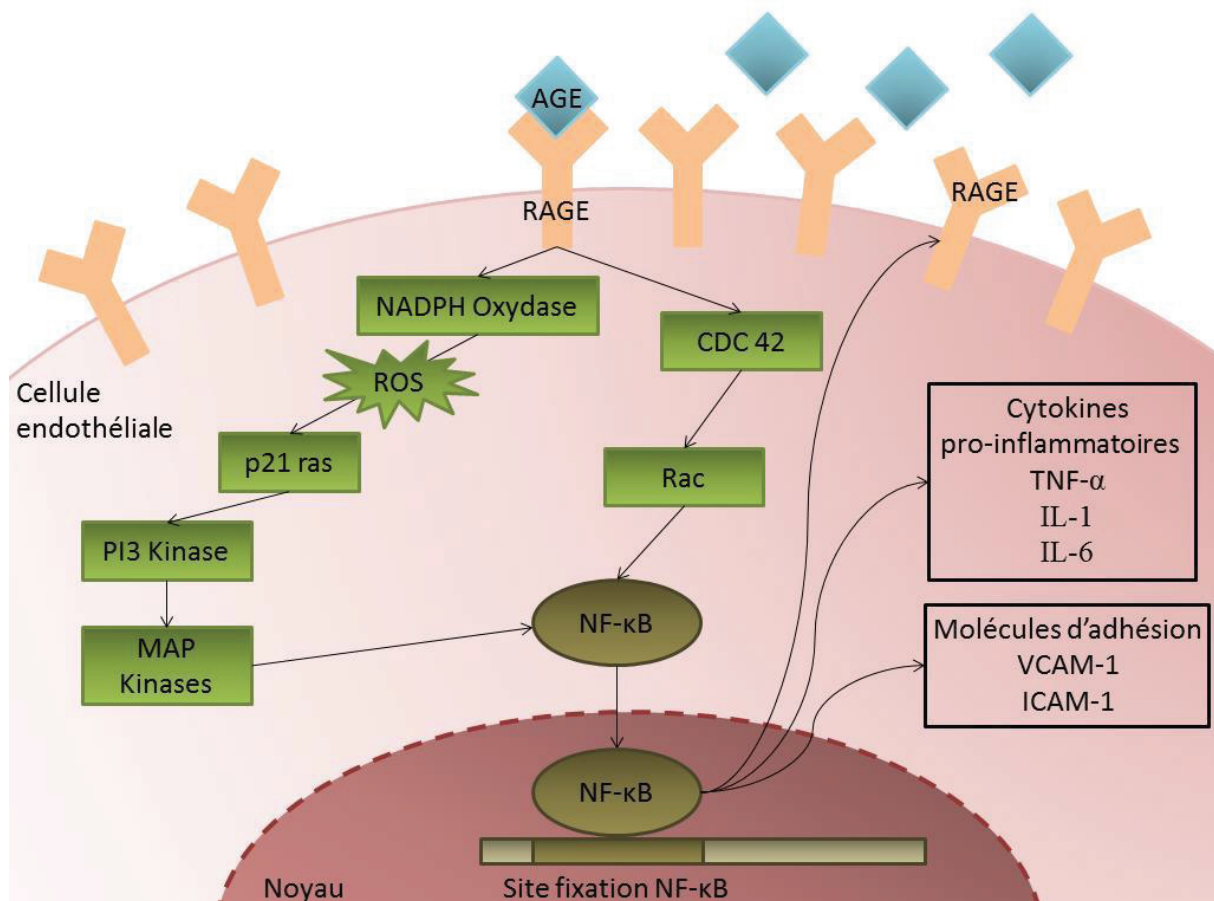


Figure 30. Voie de signalisation du RAGE.

L'activation du RAGE stimule diverses voies de signalisation (NADPH oxydase, PI₃ Kinase, MAP Kinase) qui aboutissent à la translocation nucléaire du facteur de transcription NF-κB. Ce dernier se fixe sur son promoteur situé sur de nombreux gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires et molécules d'adhérence vasculaire. Adapté de (Goldin et al., 2006).

a. *Activation de la voie de signalisation du facteur de transcription NF-κB*

Une fois activé, le RAGE déclenche diverses cascades de signalisation cellulaire dont la voie des MAPKs (Mitogen-activated Protein Kinases), la voie de la PI3K (Phosphatidylinositol-3 Kinase) et le complexe NADPH oxydase générant des ROS, seconds messagers de signalisation (Figure 30) (Basta et al., 2005; Lin et al., 2009). La conséquence de l'activation de ces trois voies aboutit à la stimulation du facteur de transcription redox-sensitif, NF-κB. En conditions basales, NF-κB est séquestré dans le cytoplasme par le complexe inhibiteur IκB (Sun and Andersson, 2002). L'arrivée d'un stimulus entraîne la phosphorylation et l'activation d'IKK (IκB kinase) qui phosphoryle sur des résidus sérine le complexe IκB, alors reconnu et ubiquitinylé par une ubiquitine ligase E3 (Sun and Andersson, 2002). IκB, ainsi dégradé par le protéasome, relâche NF-κB qui sera libre de transloquer dans le noyau où il se fixera sur la région promotrice de nombreux gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, TNF-α), des molécules d'adhérence (sélectines, VCAM-1, ICAM-1), des facteurs angiogéniques (VEGF, HIF-1α), de facteurs coagulants (Facteur tissulaire), de l'endothéline-1 et de RAGE lui-même (Goldin et al., 2006).

b. *RAGE, Intégrine Mac-1 et adhérence vasculaire*

En 1993, Schmidt *et al.* montrent *in vitro* l'implication du RAGE dans le recrutement leucocytaire (Schmidt et al., 1993). Effectivement, en plus de l'activation de NF-κB et de ses cibles pro-inflammatoires, RAGE a été décrit comme étant un récepteur analogue des intégrines leucocytaires (Chavakis et al., 2003). Dans cette étude réalisée chez un modèle murin de péritonite, la transmigration des neutrophiles était réduite chez les souris prétraitées avec des RAGEs solubles (sRAGE) ou des souris RAGE^{-/-}. Dans cette même étude les auteurs ont montré une interaction spécifique de Mac-1 avec des sRAGEs, interaction qui était favorisée après ajout du ligand de RAGE, la s100B. RAGE participe également à la migration leucocytaire par un second mécanisme : la potentialisation de l'interaction Mac-1/ICAM-1 (Orlova et al., 2007). Ici, les auteurs observent *in vitro*, que l'amphotérine promeut une adhésion

de Mac-1 sur ICAM-1 endothélial de façon RAGE-dépendante (Orlova et al., 2007). *In vivo*, RAGE agit de manière synergique et redondante avec ICAM-1 dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium via Mac-1 (Frommhold et al., 2010).

3. RAGE et fonction vasculaire

Comme les AGEs semblent particulièrement actifs au niveau endothélial, la question de leur effet sur le tonus vasculaire a également été adressée. Bucala *et al.* caractérisent l'effet inhibiteur des AGEs sur la vasodilatation endothélium-dépendante en inactivant le NO (Bucala et al., 1991). *In vitro*, les auteurs incubent de la carboxyméthyllysine dans une solution saturée en NO et observent un piégeage dose-dépendant du NO. L'étude *in vivo*, dans laquelle des rats diabétiques (avec de fortes concentrations en AGEs) traités avec de l'aminoguanidine, un inhibiteur des AGEs, avaient des réponses vasodilatatrices endothélium-dépendante et endothélium-indépendante améliorées par rapport aux rats diabétiques sans inhibiteur, confirme l'observation faite *in vitro* (Bucala et al., 1991). Plusieurs mécanismes sous-jacents par lesquels les AGEs modifient le tonus vasomoteur ont alors été proposés.

➤ *Production de ROS suite à l'activation du RAGE* : La production de ROS secondaire à l'activation des RAGEs, est responsable d'un stress nitrosatif via la réaction de $\text{O}_2^{\cdot -}$ avec le NO pour former du peroxynitrite ONOO^- . En effet, Bucciarelli *et al.* décrivent une moindre production d' ONOO^- chez des rats traités avec des sRAGEs, inhibiteurs compétitifs des RAGEs membranaires, en mesurant dans le cœur de ces animaux une baisse de nitrotyrosine, composé issu de la réaction d' ONOO^- avec une tyrosine (Bucciarelli et al., 2006). Cette production d' ONOO^- via les RAGEs entrainerait également une augmentation de la nitration de la tyrosine portée par la prostacycline synthase (PGIS) limitant ainsi la formation de prostacycline et les phénomènes de vasodilatation subséquents (Zou et al., 2002).

➤ *Altération de la NOS endothéliale* : Les AGEs agissent aussi en amont du piégeage du NO en réduisant la demi-vie de l'ARNm de son enzyme de synthèse,

eNOS (Rojas et al., 2000) et son expression protéique (Chakravarthy et al., 1998). Néanmoins, la forme non phosphorylée d'eNOS n'étant pas la forme active de l'enzyme, il est important de savoir ce qu'il en est de la forme phosphorylée. De ce fait, Xu *et al.* ont observé une diminution de la phosphorylation d'eNOS après incubation de cellules endothéliales humaines de veines ombilicales avec des AGEs. La proportion d'eNOS phosphorylée était restaurée dans ces cellules après ajout d'anticorps anti-CML (Xu et al., 2003).

➤ *L'augmentation d'endothéline-1* : En plus d'affecter l'activité des deux vasodilatateurs majeurs PGI₂ et NO, les AGEs stimulent la synthèse d'endothéline-1, via NF-κB, dans des cellules endothéliales aortiques bovines incubées avec des érythrocytes de patients diabétiques (Quehenberger et al., 2000). Dans cette étude, la synthèse d'ET-1 était dépendante de la concentration en HbA_{1c} contenue dans les érythrocytes des patients et était potentialisée après ajout d'un plasmide surexprimant le dimère NF-κB p50/p65. Au final, ET-1 déclenchera la vasoconstriction et amplifiera l'inactivation de PGI₂ et NO (Beckman et al., 2002).

De par leurs effets multiples et redondants sur les agents vasomodulateurs, les AGEs constituent des cibles thérapeutiques de choix dans les maladies vasculaires telles que le diabète de type 2 et l'athérosclérose par exemple (Basta, 2008; Singh et al., 2014).

4. Les autres effets de l'activation des RAGEs

Hormis les trois cités précédemment, les RAGEs interviennent dans plusieurs autres mécanismes cellulaires. Parmi ces mécanismes, une activation des processus apoptotiques suite à l'interaction des RAGEs avec les AOPPs a été établie dans des podocytes rénaux (Zhou et al., 2012). Les RAGEs joueraient également un rôle dans la prolifération cellulaire via la voie des MAP kinases, dans la migration cellulaire via la petite protéine G, RhoA et dans l'autophagie via l'AMP kinase (Xie et al., 2013).

C. L'INTERVENTION DES RAGEs DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DRÉPANOCYTAIRE

Du fait des nombreuses similitudes entre les conséquences physiopathologiques liées à l'activation des RAGEs et celles liées à l'expression d'HbS, l'étude de l'impact de ces récepteurs dans la genèse du phénotype pathologique de la drépanocytose semble justifiée. Pourtant très peu d'équipes se sont intéressées à cette interaction. Les premières observations de l'implication des AGEs dans la maladie ont été faites par Somjee *et al.* qui ont noté des taux d'AGEs plasmatiques et érythrocytaires anormalement élevés chez des enfants drépanocytaires (Somjee *et al.*, 2005). Ce taux n'était en revanche pas plus augmenté chez les enfants en crise comparés aux enfants à l'état stable suggérant un rôle chronique des AGEs plutôt qu'aigu et une absence d'implication dans les complications type visco-vaso-occlusives (Somjee *et al.*, 2005). Les auteurs remarquent en outre, une corrélation négative entre la concentration érythrocytaire en GSH et la concentration plasmatique en AGEs. Or, il a été montré qu'une telle association contribuait au développement de complications microvasculaires dans le diabète (Thornalley *et al.*, 1996) ce qui peut suggérer que les AGEs sont capables d'entraîner le même type de complications chez les patients drépanocytaires. La présence d'AGEs plasmatiques en excès a été confirmée chez des patients S/S adultes et leur concentration était corrélée négativement avec l'hémoglobine totale et le taux d'hématocrite et corrélée positivement avec la concentration en LDH et le pourcentage de réticulocytes (Nur *et al.*, 2010). Les AGEs auraient donc un rôle important dans la physiopathologie des complications tissulaires liées à l'hémolyse chronique. Une forte corrélation entre la concentration d'AGEs et celle de VCAM-1 soluble dans le plasma pourrait suggérer également une implication de la voie du RAGE dans l'activation endothéliale (Nur *et al.*, 2010). Parallèlement, une augmentation des taux plasmatiques d'HMGB-1 a été mesurée chez des souris BERK et chez des patients drépanocytaires, taux qui étaient d'autant plus élevés lors d'une CVO (Xu *et al.*, 2014). Dans cette étude, les auteurs se sont focalisés sur la forte interaction existant entre HMGB-1 et TLR4, un membre de

la famille des récepteurs « PRR » dont font aussi partie les RAGEs (cf. IV.B.2.). Enfin, une étude réalisée très récemment au sein de notre équipe montre une hausse des concentrations plasmatiques en AGEs chez des patients diabétiques porteurs du trait drépanocytaires par rapport à des sujets sains ou PTD mais aussi par rapport à des patients diabétiques non PTD confirmant le lien physiopathologique entre les AGEs et l'HbS (Diaw et al., 2015a). Les AGEs étaient associés à la vitesse d'onde de pouls, paramètre reflétant la rigidité artérielle, ce qui suggère un rôle potentiel des AGEs dans le remodelage vasculaire retrouvé dans la drépanocytose (Ravelojaona et al., 2015).

PARTIE 3

-

Contribution Personnelle



Objectifs et hypothèses de travail

Il est aujourd'hui largement admis que l'inflammation et le stress oxydant sont des acteurs majeurs de la pathogenèse drépanocytaire et des multiples complications organiques associées. Il semble alors indispensable d'établir des stratégies thérapeutiques visant à limiter ces paramètres ayant un rôle délétère chez les patients atteints par cette maladie. Or comme nous l'avons détaillé dans la revue de littérature (cf. PARTIE 2 - III et IV), les RAGEs et l'entraînement physique constituent deux voies distinctes mais prometteuses de modulation favorable des processus inflammatoires, oxydants et vasomodulateurs dans la drépanocytose. Ce travail de thèse vise donc à apporter des éléments supplémentaires quant à l'implication de ces modalités dans la physiopathologie drépanocytaire qui n'ont, à ce jour, pas été suffisamment explorées.

Deux hypothèses principales ont conduit ce travail de thèse : 1) de par ses effets antioxydants, anti-inflammatoires et limitant les dysfonctions vasculaires l'exercice physique chronique pourrait limiter le stress oxydant, le profil inflammatoire et favoriser le métabolisme du NO dans la drépanocytose ; 2) les RAGEs pourraient jouer un rôle important dans la physiopathologie drépanocytaire en majorant le stress oxydant et l'inflammation et en limitant le métabolisme du NO dans la drépanocytose. Ces hypothèses sont décrites dans la figure 31 qui détaille les possibles actions des deux approches utilisées sur les mécanismes physiopathologiques de la drépanocytose.

Les objectifs principaux de ce travail sont de déterminer les effets d'une activité physique régulière, d'une part, et d'identifier le rôle des RAGEs, d'autre part, dans l'entretien du cercle vicieux de la drépanocytose en se concentrant sur l'inflammation, le stress oxydant et le métabolisme du NO chez des souris transgéniques porteuses de la maladie.

Pour atteindre ces objectifs, quatre études sont présentées dans ce chapitre et ont pour but d'alimenter la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la maladie grâce à une approche sportive dans un premier temps (Etudes 1 et 3) et une approche pharmacologique dans un second temps (Etude 4). Sachant que l'ensemble des travaux porte sur des réponses tissu-spécifiques aux différentes interventions appliquées, ils ont tous été effectués sur des modèles murins de la maladie.

✓ Etude 1 : Dans cette première étude, l'objectif était de déterminer les effets d'une activité physique régulière en réponse à un stress d'hypoxie/réoxygénation chez des souris drépanocytaires SAD. Pour cela, nous avons mis au point un protocole d'activité physique volontaire chez un modèle murin présentant un phénotype modéré de drépanocytose. Ces souris développent des complications caractéristiques de la maladie – particulièrement au niveau des poumons - en réponse à un stress d'hypoxie/réoxygénation qui engendre l'apparition d'occlusions vasculaires. Le but de ce travail était de déterminer si les marqueurs moléculaires d'un stress vaso-occlusif pouvait être réduits par l'entraînement dans le poumon de souris SAD. Des marqueurs du métabolisme du NO (eNOS, eNOS phosphorylée, Nitrite/Nitrate) ont alors été mesurés ainsi que ceux du stress oxydant dans le cœur et de l'hémolyse dans le compartiment plasmatique.

La suite des études a été réalisée sur le modèle Townes présentant un phénotype à l'état stable plus fidèle de la drépanocytose que le modèle SAD.

✓ Etude 2 : La souris Townes fait partie des modèles murins de la drépanocytose, les plus utilisés à ce jour. Malgré cela, le profil inflammatoire et du stress oxydant n'a été que peu décrit chez ces animaux au phénotype drépanocytaire très proche de celui de l'Homme. Cette deuxième étude descriptive vise donc à établir le phénotype moléculaire inflammatoire et du stress oxydant basal des principaux organes affectés par la maladie chez des souris Townes. Cette étude sert de base aux études suivantes

en permettant de mieux cibler les voies/molécules d'intérêt, susceptibles d'être modulées par les diverses interventions. L'expression de marqueurs du stress oxydant, de molécules d'adhérence vasculaire, de marqueurs pro-inflammatoires et du métabolisme du NO a alors été quantifiée dans le cœur, les poumons, le foie, les reins et la rate de souris Townes à l'état stable.

✓ Etude 3: Ce travail a consisté en une investigation de l'impact d'un entraînement sur tapis roulant à intensité modérée chez des souris Townes. En s'appuyant notamment sur l'étude 2, les mesures ont ciblé les marqueurs du stress oxydant dans le cœur et le foie, les marqueurs de l'activation endothéliale et de l'inflammation dans le rein et dans le plasma. Une exploration histologique de la rate et des dosages des marqueurs de l'hémolyse ont également été opérés afin d'évaluer de façon la plus exhaustive possible les effets d'un exercice chronique sur un modèle de souris homozygote pour la mutation drépanocytaire.

✓ Etude 4: Ici, le but était de tester l'implication des RAGEs dans la physiopathologie drépanocytaire. Pour se faire, nous avons procédé à une inhibition spécifique des RAGEs grâce à un composé pharmacologique antagoniste de ces récepteurs chez les souris Townes. A l'issue de 3 semaines d'injections intrapéritonéales quotidiennes, nous avons dosés des marqueurs de l'inflammation, d'activation endothéliale du stress oxydant et du métabolisme du NO dans les principaux organes touchés (Cœur, foie, rein) en se basant de nouveau sur les résultats obtenus dans l'étude 2.

**Etude 1 : Le stress oxydant est diminué chez des souris SAD
drépanocytaires physiquement actives**

Charrin E., Aufradet E., Douillard A., Romdhani A., De Souza G., Bessaad A., Faes C.,
Chirico E.N., Pialoux V., Martin C.

Publié dans *British Journal of Haematology* (2014). **168**, 747-756

Dans la drépanocytose, l'exercice physique est quasiment exclusivement utilisé comme outil de diagnostic pour identifier d'éventuelles anomalies cardiovasculaires et pulmonaires (Gordeuk et al., 2011; Hostyn et al., 2013; Liem et al., 2015a; van Beers et al., 2014). Mais l'émergence de l'exercice régulier comme voie thérapeutique à part entière qui limite les complications organiques et améliore la qualité de vie dans de nombreuses maladies chroniques justifie l'hypothèse de ses effets bénéfiques dans la drépanocytose. Le caractère potentiellement dangereux d'un exercice aigu dans cette population de malades freine l'avancée des recherches et rend alors nécessaire l'utilisation préalable de modèles murins. Le phénotype drépanocytaire du modèle de souris transgéniques SAD est peu sévère à l'état stable puisque ces souris n'expriment que 19% d'hémoglobine mutée (Trudel et al., 1991) alors que chez les patients homozygotes ce taux atteint 95%. Cependant, l'association des trois mutations portées par le transgène β^{SAD} conduit à une sensibilité érythrocytaire à la désoxygénation exacerbée et aggrave donc la sévérité de la maladie, et ce, particulièrement au niveau pulmonaire (De Franceschi et al., 2003).

Deux études récemment réalisées au sein de notre laboratoire se sont intéressées aux effets d'une activité physique volontaire en roue d'activité sur l'activation endothéliale pulmonaire et sur la rhéologie sanguine chez des souris SAD (Aufradet et al., 2014; Faes et al., 2015). Ainsi, la pratique d'une activité physique régulière limite l'activation endothéliale pulmonaire, diminue la viscosité sanguine et augmente le ratio hématocrite/viscosité sanguine, indice reflétant la capacité de transport de l'O₂ par les GRs. Ces études ne précisent cependant pas si l'activité physique module ou non le stress oxydant, l'inflammation et le métabolisme du NO, facteurs étant fortement impliqués dans la mise en place de la drépanocytose (*cf.* PARTIE 2 - II). Or, comme précisé dans le chapitre III.B.1 de ce manuscrit, l'activité physique est un puissant régulateur de ces 3 paramètres physiopathologiques. Ainsi, il nous a paru intéressant et nécessaire de déterminer si, dans le cadre de la drépanocytose, l'activité physique était capable d'améliorer les statuts redox,

inflammatoire et vasomoteur. Des études complémentaires, notamment sur le rôle de l'exercice chronique sur le stress oxydant et la biodisponibilité du NO sont, malgré tout, nécessaires avant de confirmer le pouvoir thérapeutique de l'entraînement dans la drépanocytose.

Ce travail cible donc des marqueurs du stress oxydant et du métabolisme du NO en réponse à un entraînement volontaire chez des souris SAD. A l'exercice, le stress oxydant étant particulièrement augmenté dans le cœur, nous avons procédé à des dosages d'un marqueur de peroxydation lipidique, MDA et d'enzymes antioxydantes GPx, SOD et catalase dans cet organe chez des souris SAD entraînées soumises à un stress d'H/R comparées à leurs homologues sédentaires et/ou non soumis au stress hypoxique. Les effets de l'entraînement physique sur des acteurs du métabolisme du NO (i.e. eNOS, eNOS phosphorylée et nitrite/nitrate) ont également été mesurés dans le poumon, organe sévèrement affecté par le stress vaso-occlusif d'H/R chez les souris SAD.

Oxidative stress is decreased in physically active sickle cell SAD mice

Emmanuelle Charrin, Emeline Aufradet, Aymeric Douillard, Aymen Romdhani, Genevieve De Souza, Amine Bessaad, Camille Faes, Erica N. Chirico, Vincent Pialoux and Cyril Martin

EA 647, Center of Research and Innovation on Sports, University of Lyon, Lyon, France

Received 16 July 2014; accepted for publication 29 September 2014

Correspondence: Cyril Martin, Center of Research and Innovation on Sports (CRIS EA 647), 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

Summary

Oxidative stress plays a crucial role in sickle cell disease (SCD) physiopathology. Given that chronic physical activity is known to decrease reactive oxygen species (ROS) and increase nitric oxide (NO) bioavailability in healthy subjects and in patients with cardiovascular or inflammatory pathologies, modulating these factors involved in the severity of the pathology could also be beneficial in SCD. This study aimed to determine if 8 weeks of increased physical activity (PA) by voluntary wheel running affects the hypoxia/reoxygenation (H/R) responses by reducing oxidative stress and increasing NO synthesis in sickle SAD mice. Nitrite/nitrate (NOx) concentrations, NOS3 mRNA expression and phosphorylated-endothelial nitric oxide synthase immunostaining were increased in the lungs of the PA groups after H/R stress. Moreover, lipid peroxidation in the heart was decreased in PA SAD mice. The improvement of antioxidant activity at rest and the decrease in haemolysis may explain this reduced oxidative stress. These results suggest that physical activity probably diminishes some deleterious effects of H/R stress in SAD mice and could be protective against vascular occlusions.

Keywords: voluntary wheel running, nitric oxide bioavailability, lipid peroxidation, haemoglobinopathy.

Sickle cell disease (SCD) is a genetic pathology characterized by a single mutation in the β -haemoglobin (Hb) gene (*HBB*) (Rees *et al*, 2010). During periods of deoxygenation, abnormal Hb (HbS) leads to HbS-polymer formation and sickling of red blood cells (RBCs) (Rees *et al*, 2010). It contributes to haemolytic anaemia and vascular occlusions, the two major detrimental complications of SCD. Vaso-occlusive crises (VOC) leading to local ischaemia-reperfusion and intravascular haemolysis result in a pro-oxidative status through the production of reactive oxygen species (ROS). In turn, oxidative stress decreases nitric oxide (NO) bioavailability, inhibiting its anti-oxidative and vasodilatory properties and worsens the haemolysis, generating a vicious circle (Chirico & Pialoux, 2012).

Recently, several studies have examined the role of acute physical activity in SCD (Connes *et al*, 2011) and showed that moderate exercise was not harmful in SCD patients (Balayssac-Siransy *et al*, 2011; Faes *et al*, 2014) and could have even induced a beneficial effect on blood rheology (Waltz *et al*, 2012). In healthy subjects, as well as in some cardiovascular and inflammatory diseases, chronic exercise

has been shown to limit oxidative stress via the increase of enzymatic antioxidant activity (Radák *et al*, 2004) or the improvement of NO bioavailability (Hambrecht *et al*, 2003). Taken together, these results suggest that habitual physical activity could be beneficial for SCD subjects by limiting physiological factors involved in the pathophysiology of SCD. In previous studies, we tested the effects of habitual physical activity in heterozygous carriers of HbS, namely sickle cell trait (SCT) carriers (Aufradet *et al*, 2010; Chirico *et al*, 2012). These studies reported beneficial effects of habitual physical training on the endothelial function of SCT carriers including reduction of oxidative stress markers (lipid and protein oxidations) and increase of both antioxidant activity and NO availability (Chirico *et al*, 2012). Finally, these results strengthen the hypothesis that habitual physical activity probably reduces oxidative stress and enhances NO bioavailability in carriers of HbS.

As acute moderate exercise does not seem to be harmful in SCD patients (Balayssac-Siransy *et al*, 2011; Waltz *et al*, 2012) and chronic exercise has multiple beneficial effects on other pathologies (Radák *et al*, 2004; Balducci *et al*, 2010),

E. Charrin *et al*

the present study aimed to investigate the effects of chronic physical activity on oxidative stress and NO metabolism in SCD at baseline and in response to a severe hypoxia/reoxygenation (H/R) stress.

Methods

We chose to work on SAD transgenic sickle mice, which have been shown to mimic human VOC when submitted to a severe hypoxia/reoxygenation stress (Trudel *et al*, 1994; Aufradet *et al*, 2013). Eight weeks of a voluntary wheel running protocol were conducted in the mice. Before sacrificing the animals, a H/R stress was used to trigger VOC events (Aufradet *et al*, 2013).

Animals

Healthy (C57Bl/6J) and SAD male mice (13 weeks old) were used in this study. The SAD transgene reproduces the hypoxia-induced VOC events of human SCD in SAD mice (Trudel *et al*, 1994). C57Bl/6J mice (Charles River, L'Arbresle, France) were used as the control animal. The guidelines from the French Ministry of Agriculture for experimental procedures and the Institute for Laboratory Animal Research (National Academy of Sciences, USA) were followed and the protocol was approved by the regional animal care committee (Rhône-Alpes, France).

Experimental protocol

Thirty-two SAD mice and 37 C57Bl/6J (C57) mice were randomly divided into four groups in each strain, as detailed in Table I. For a period of 8 weeks, control mice (CON) lived in

standard mouse cages while physical activity mice (PA) were housed in cages equipped with running wheels. Voluntary wheel running has been chosen because it is a valid training method in mice which induces beneficial physiological adaptations to physical activity without any additional stress compared to forced treadmill running (Moraska *et al*, 2000). After 8 weeks, mice were euthanized either after normoxic conditions (Nx) or after exposure to an acute 4-h hypoxic stress at 6.5% oxygen followed by 2 h of reoxygenation in ambient air (HR). We recently showed that this type of H/R stress stimulates the same factors that are involved in human VOC (inflammation, adhesion molecules and oxidative stress) (Aufradet *et al*, 2013). The oxygen level of the hermetic cage (Biospherix, Lacona, NY, USA) was regulated with an oxygen sensor system (Pro-ox; Biospherix) using pure nitrogen gas (Nitrogen 4.5; LindeGaz s.a, St Priest, France).

Physical activity

During the 2 first weeks of training, mice were housed two per cage with or without running wheels (PA and CON groups, respectively). Then, mice were assigned to an individual cage for 6 weeks as previously reported (Aufradet *et al*, 2012). The cages used for physical activity were equipped with a 12.5 cm mouse 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 experimental period, total running distance and the weight of each mouse were recorded each week. Mice were maintained on a 12 h light-dark cycle with food and water *ad libitum*.

Table I. Mice distribution and blood parameters after hypoxia/reoxygenation stress (HR) or not (Nx) in physical activity (PA) or control (CON) C57Bl/6 (C57) and SAD mice.

	Mice distribution, <i>n</i>	Haematocrit (%)	RBC ($10^{12}/l$)	Reticulocytes (%)	WBC ($10^9/l$)	Platelets ($10^9/l$)
C57 _{CON}						
Nx	7	45.9 ± 0.9	9.36 ± 0.28	2.30 ± 0.25	2.16 ± 0.45	813 ± 44
HR	7	46.1 ± 0.7	9.94 ± 0.31	2.26 ± 0.27	0.96 ± 0.24a	906 ± 13
C57 _{PA}						
Nx	7	46.8 ± 1.2	9.65 ± 0.37	1.94 ± 0.32	2.08 ± 0.31	866 ± 40
HR	8	43.9 ± 0.4*	9.12 ± 0.10	2.30 ± 0.29	1.02 ± 0.17*	761 ± 87
SAD _{CON}						
Nx	6	39.2 ± 1.0	8.72 ± 0.35	5.67 ± 1.18	5.16 ± 0.74	1218 ± 107
HR	6	40.2 ± 0.8	9.04 ± 0.23	5.61 ± 1.33	3.92 ± 0.86b	1370 ± 117
SAD _{PA}						
Nx	6	39.7 ± 0.9	9.20 ± 0.21	5.83 ± 0.97	4.68 ± 0.95	1304 ± 107
HR	6	38.0 ± 1.8	8.79 ± 0.28	4.99 ± 1.24	3.32 ± 0.34	1528 ± 196
C57 vs. SAD	–	<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> < 0.05
Nx vs. HR	–	–	–	–	<i>P</i> < 0.05	–

Values are means ± SE.

RBC, red blood cell count; WBC, white blood cell count.

**P* < 0.05 vs. normoxic of the same group; ^a*P* = 0.06 vs. C57_{CON}Nx; ^b*P* = 0.09 vs. SAD_{CON}Nx.

Tissue sampling

After the end of the reoxygenation period, mice were anaesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (50 mg/kg, Dolethal[®]; Vétoquinol, Lure, France) and blood was collected by a retro-orbital venepuncture into heparinized tubes for haematological and plasma analysis. Mice were sacrificed by exsanguination with a 0.9% NaCl transcardial perfusion for 90 s. The heart and the lungs were collected. The cardiac left ventricle (LV) and the right lung were weighed and immediately frozen in liquid nitrogen for oxidative stress, nitric oxide metabolism and enzymatic activity measurements, respectively. The left lung was treated with a specific protocol (described below) for immunohistological analyses.

Haematology

Haematocrit, red blood cell counts (RBC), white blood cell counts (WBC) and platelet counts were determined 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 using a commercial kit (Quantichrom[™] Lactate Dehydrogenase Kit; BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) according to the manufacturer's instructions with a detection limit of 2 iu/l.

Immunohistology

Slides were prepared from the left lungs. The tissue was pre-treated after dissection with a tracheal injection of 1/3 cryomatrix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) diluted in phosphate-buffered saline (PBS) 1× (VWR, West Chester, PA, USA) and fixed in a 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in a 0.1 mol/l PBS solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 2 h, then incubated for 24 h in 25% sucrose (Sigma-Aldrich) for cryoprotection and finally frozen in -40°C isopentane (VWR) before storage at -80°C. Immunostaining was performed on 7 µm sections of left lung. Briefly, sections were incubated for one night at 4°C with a goat polyclonal phosphorylated endothelial nitric oxide synthase, p-NOS3 [also termed p-eNOS], primary antibody diluted at 1:50 (Ser 1177, sc-12972; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). After washing, sections were then incubated with a biotinylated Bovine anti-goat antibody (805-065-180; Jackson Immuno-Research, Suffolk, UK) diluted at 1:500. Exposure was performed with the avidin-biotin enzyme complex (Vectastain Elite ABC standard peroxidase Kit; Vector Lab, Burlingame, CA, USA) and the substrate 3,3'-diaminobenzidine (DAB Peroxidase Substrate Kit; Vector Lab, Burlingame, CA, USA). Expression of p-NOS3 was semi-quantified by estimation of percentage of blood vessels immunostained from one section. For each vessel, a score from 0 to 3 was attributed (0: no

immunostaining, 1: less of 25% of vessel staining, 2: less of 50% of vessel staining, 3: more than 50% of vessel staining). For each mouse, the immunostaining score was the mean of each vessel score from a section. Analysis was blindly performed by two investigators under a light microscope (BX43 Microscope; Olympus, Tokyo, Japan) and images were captured with a video camera (SC30; Olympus) coupled to an image analysis system (ANALYSIS[®] getIT! 5.1; Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany).

Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

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/µl. One thousand nanogram per sample of total mRNA were reverse transcribed to cDNA with the reverse transcriptase RNase Hminus (Promega, Madison, WI, USA) using oligo (T)15 (Eurogentec, Seraing, Belgium). RT calibration was done in the presence of 80 pg of a synthetic external and non-homologous 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 15 min at 95°C for denaturing followed by 45 cycles of amplification (15 s at 94°C for denaturation, 30 s at 58°C for annealing and 6 s at 72°C for extension). Results obtained for the targeted mRNAs were normalized against the SmRNA. The primer pair used was: NOS3; 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).

Nitrite/Nitrate assay

The right lung was homogenized in a buffer solution (Tris 20 mmol/l, NaCl 100 mmol/l, EGTA 1 mmol/l, Triton 100× at 0.5%; Sigma Aldrich) containing a protease inhibitor cocktail 1 nmol/l (Abcam, Cambridge, UK) at 4°C. After a centrifugation at 12 000 g for 10 min at 4°C, the supernatant was used for protein content (bicinchoninic acid [BCA] protein assays Kit; Novagen, Darmstadt, Germany) and Nitrite/Nitrate assay. The end-products nitrite/nitrate were measured in the plasma using the method of Griess (Misko *et al*, 1993). The sum of nitrite and nitrate in the plasma (NOx) is considered as an index of nitric oxide production (Hebbel *et al*, 1982).

Oxidative stress

The LV was homogenized (10%, w/v) in PBS 1× + EDTA 0.5 mmol/l on ice. After centrifugation at 1500 g for 4 min

E. Charrin *et al*

at 4°C the supernatant was collected for malondialdehyde (MDA) and protein measurements. A second centrifugation was performed at 12 000 g for 10 min at 4°C and the resulting supernatant was used for the other measurements. Homogenate aliquots were stored at -80°C. Protein concentrations in LV were determined using the BCA protein assays Kit (Novagen) in accordance with the manufacturer's instructions. All the products used for oxidative stress measurements came from Sigma-Aldrich and spectrophotometric measurements were performed on TECAN Infinite 2000 plate reader (Männedorf, Switzerland). Results were standardized per mg of total protein.

Malondialdehyde concentration was determined as previously described (Faes *et al*, 2012) using thiobarbituric acid. The pink chromogen was extracted with n-butanol and MDA concentration was calculated using 1,1,3,3-tetraethoxypropane as standard. Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined by the modified method of Paglia & Valentine, 1967. GPx activity represents the rate of NADPH elimination in NADP⁺ after addition of glutathione reductase, reduced glutathione and NADPH using hydrogen peroxide (H₂O₂) as substrate. Catalase activity was determined by the reaction of methanol and H₂O₂, which lead to formaldehyde formation using catalase as enzyme, as previously described (Johansson & Borg, 1988). Superoxide dismutase (SOD) activity was determined using the Oberley and Spitz method (Oberley & Spitz, 1984) and represents the degree of inhibition of the reaction between superoxide radicals, produced by a hypoxanthine – xanthine oxidase system, and nitroblue tetrazolium.

Statistics

All statistical analyses were performed using STATISTICA Software (Tulsa, OK, USA). All variables were tested for normality and variance homogeneity. NOx concentrations, relative heart and left ventricle weights, reticulocytes, WBC and platelet counts were tested with non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Dunn test. The other variables were compared using factorial analysis of variance (ANOVA) followed by planned comparisons. A *P*-value < 0.05 was

considered statistically significant and *P*-values between 0.05 and 0.1 were considered as statistical tendencies. The data were expressed as means ± standard error (SE).

Results

Physical activity

Independent 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 II). In both strains, physical activity was associated with a significant increase in HW/BW and LVW/BW and a significant decrease in body weight compared to CON groups.

Haematological characteristics

Compared to C57 mice, SAD mice exhibited higher reticulocyte, WBC and platelet concentrations and lower haematocrit and RBC values (Table I). Physical activity modulated LDH concentration (Fig 1) and WBC in SAD mice. In response to H/R stress, WBC tended to decrease in SAD_{CON} (*P* = 0.09; Table I) but not in SAD_{PA}. Absolute values of LDH have been published before (see Aufradet *et al*, 2014 for more details). When these data are expressed as percent of Nx concentrations (Fig 1), our results show that LDH variation compared to normoxic values is lower in the SAD_{PA}HR than in SAD_{CON}HR (Fig 1; *P* < 0.05).

NO metabolism in the lungs

While NOx concentrations in normoxia did not differ between groups (absolute values of NOx have been previously published in Aufradet *et al*, 2014; submitted to a different type of analysis in the present article), their levels in response to H/R stress were significantly increased by physical activity in C57 and SAD mice (*P* < 0.05; Fig 2B). Baseline NOS3 mRNA was not different among the four groups. Hypoxia/reoxygenation stress significantly increased NOS3 mRNA for all groups (*P* < 0.05) except SAD_{CON} mice

Table II. Characteristics of animals after physical activity protocol (PA) in wild type (C57) and SAD mice.

	HW/BW (mg/g)	LVW/BW (mg/g)	Body weight (g)	Distance run (km/week)
C57 _{CON}	4.91 ± 0.13	3.90 ± 0.08	30.61 ± 0.36	–
C57 _{PA}	5.40 ± 0.11 ^a	4.18 ± 0.09*	29.84 ± 0.48	18.70 ± 1.89
SAD _{CON}	5.97 ± 0.16§	4.45 ± 0.16§	29.63 ± 0.51	–
SAD _{PA}	7.06 ± 0.37*#	5.08 ± 0.23#	27.71 ± 0.35*#	28.59 ± 3.83#
C57 vs. SAD	<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> < 0.05	–
CON vs. PA	<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> < 0.05	–

Values are means ± SE.

CON, control mice; HW/BW, heart weight/body weight; LVW/BW, left ventricular weight/body weight.

**P* < 0.05 vs. CON of the same group; §*P* < 0.05 vs. C57_{CON}; #*P* < 0.05 vs. C57_{PA}; ^a*P* = 0.09 vs C57_{CON}.

Physical Activity in Sickle SAD Mice

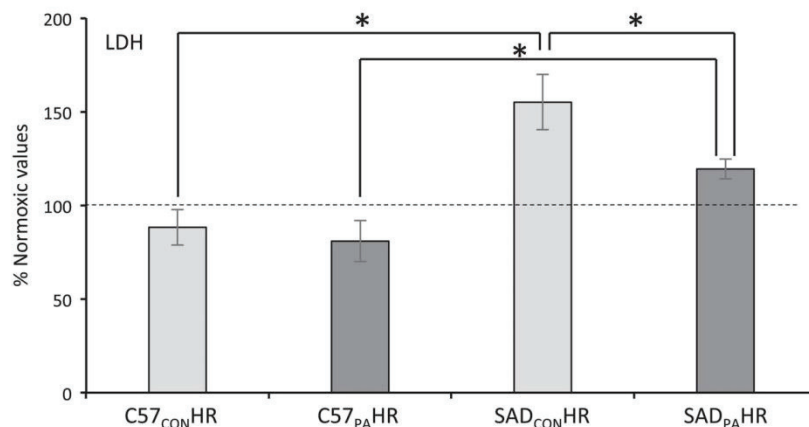


Fig 1. Plasma lactate dehydrogenase (LDH) variation after hypoxia/reoxygenation stress (HR) in physical activity (PA) or control (CON) C57Bl/6 (C57) and SAD mice. Results are expressed as percentage of the normoxic values. *: $P < 0.05$. Values are means \pm SE. Absolute values of baseline data from fig 1 have previously been published (Aufradet *et al*, 2014).

(Fig 2A). No significant difference in p-NOS3 immunostaining was observed between C57 and SAD, or between CON and PA mice in normoxic conditions (Fig 2C, D). Physical activity enhanced p-NOS3 staining in H/R C57 and SAD mice compared with their CON counterparts (+39% and +35%, respectively; $P < 0.05$; Fig 2C, D). Furthermore, in SAD mice, p-NOS3 staining was decreased only in sedentary mice in response to H/R stress (*versus* Nx; $P < 0.05$) and was significantly lower than in SAD_{PA}HR.

Oxidative stress in the heart

Malondialdehyde concentration tended to be higher ($P = 0.08$) in the SAD_{PA} mice than SAD_{CON} (Fig 3A). After the H/R stress, MDA concentrations tended to increase in SAD_{CON} mice (+20% vs. SAD_{CON}Nx; $P = 0.07$; Fig 3B), but not in SAD_{PA} mice. Moreover, SAD_{PA} mice exhibited lower MDA variation after the H/R stress than their control counterparts (SAD_{PA}HR vs. SAD_{CON}HR: -22.4% ; $P < 0.05$).

Antioxidant enzymes activities

Baseline GPx activity was significantly higher in the SAD_{PA} group compared to their control counterparts (+96%; $P < 0.05$; Fig 3C). After the H/R stress (Fig 3D), GPx activity significantly decreased in SAD_{PA} (SAD_{PA}HR vs. SAD_{PA}Nx; $P < 0.05$) whereas it did not significantly change in C57 mice and in SAD_{CON}. Catalase and SOD activities are presented in Table III. After H/R, catalase activity of SAD_{PA} tended to be lower than in SAD_{CON} (-16% ; $P = 0.051$). 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 2 h of reoxygenation compared to Nx in PA mice only ($P < 0.05$).

Discussion

This study used murine models of SCD to determine the impact of habitual physical activity on the nitric oxide (NO)

metabolism and oxidative stress responses to H/R stress, which is known to trigger VOC in these models.

The main result of this study was the decrease in oxidative stress in response to H/R stress and an increased baseline antioxidant activity in the heart of physically active SAD mice. In addition NO metabolites, NOS3 mRNA levels and p-NOS3 expression were increased in the lungs of PA mice in response to H/R stress.

The weekly distance covered by the two mice strains (C57Bl/6 and SAD) in the voluntary wheel running protocol was in accordance with the literature (Konhilas *et al*, 2004; Davidson *et al*, 2006) suggesting that the β^{SAD} transgene does affect voluntary physical activity behaviour. Moreover, the increase in relative heart weight and left ventricle weight in PA groups confirm the efficiency of voluntary wheel running training in C57 as in SAD mice (Aufradet *et al*, 2012).

Our results did not reveal a difference in p-NOS3 levels between SAD_{CON} and C57_{CON} mice at baseline. This contrasts with studies of Bank *et al* (1996) and Kaul *et al* (2000), which reported total NOS3 levels in sickle cell mouse models, which would be the consequence of the chronic high wall shear stress applied on the endothelial cells. However, there are some differences between these studies and the present one. The models of transgenic sickle mice used in these two previous study are more severe than the SAD mice used in this study, and different organs were studied. Moreover, the present study measured the activated form of NOS3 (p-NOS3), and not the total form. Our results are also supported by similar NOx results (i.e. non-significant increase between SAD and C57 in baseline). Given that SAD mice are known to express pathological features under H/R this may explain lack of statistical difference observed in baseline for both p-NOS3 and NOx.

The increase in cardiac lipid peroxidation after H/R only in control SAD mice suggests that the HbS mutation probably increases oxidative stress. This result is in agreement with previous studies reporting increased oxidative stress after H/R stress in sickle mice models (Osarogiabon *et al*, 2000; Aufradet *et al*, 2013). Concomitantly, in SAD control mice, H/R

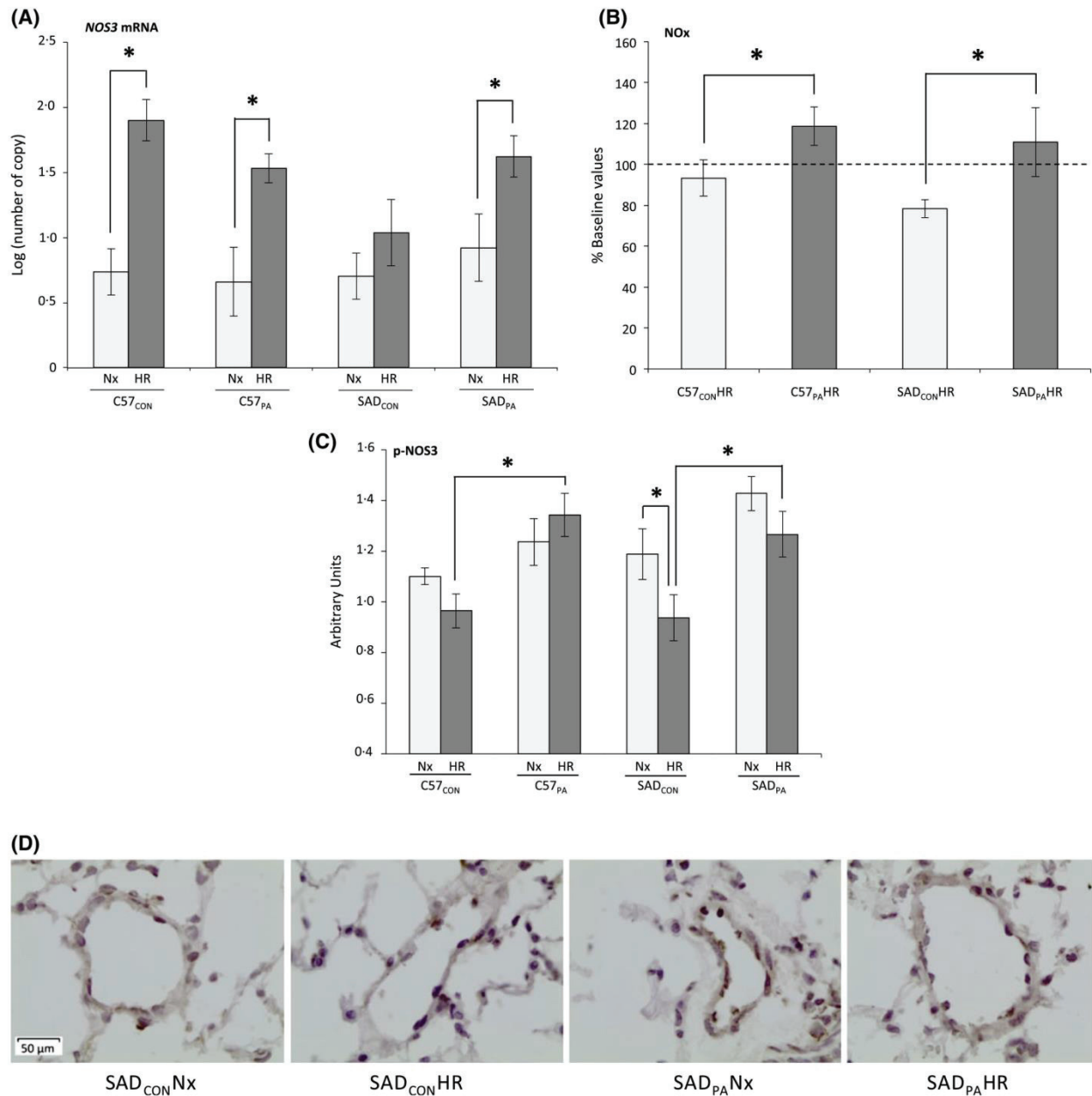
E. Charrin *et al*

Fig 2. NO metabolism after hypoxia/reoxygenation stress (HR) in the lungs of physical activity (PA) or control (CON) C57Bl/6 (C57) and SAD mice. (A) Logarithmic mRNA expression of *NOS3* under normoxia (Nx) and hypoxia followed by 2 h reoxygenation (HR) in physical activity (PA) or control (CON) C57Bl/6 (C57) and SAD mice lungs. *: $P < 0.05$. Values are means \pm SE. (B) Nitrite/nitrate (NOx) variations compared to normoxia values; data were expressed as percentage of the normoxic values. *: $P < 0.05$. Values are means \pm SE. (C) Immuno-histological slides were semi-quantified for p-NOS3 with the staining intensity and a score described in Methods. *: $P < 0.05$; a: $P = 0.053$ vs. SAD_{CON}Nx. Values are means \pm SE. (D) Staining for p-NOS3 in the blood vessel of lung in the SAD mice in function of wheel running at baseline and after hypoxia and 2 h of reoxygenation. Magnification $\times 1000$. Absolute values of baseline data from fig 2B have previously been published (Aufradet *et al*, 2014).

stress induced a drop in p-NOS3 expression and blunted the increase in *NOS3* mRNA levels (Fig 2A, C, D). It may be hypothesized that the ROS over-generation triggered by H/R in SAD mice could alter both *NOS3* production and activation. This hypothesis is supported by the work of Pritchard *et al* (2004), which showed a decrease of p-NOS3 in rat

pulmonary microvascular endothelial cells in presence of superoxide anions (Pritchard *et al*, 2004). However, as we did not observe statistical difference in lung MDA between these groups (data not shown), further studies should verify this hypothesis. To the best of our knowledge, this study is the first to show a diminished p-NOS3 in sickle SAD mice.

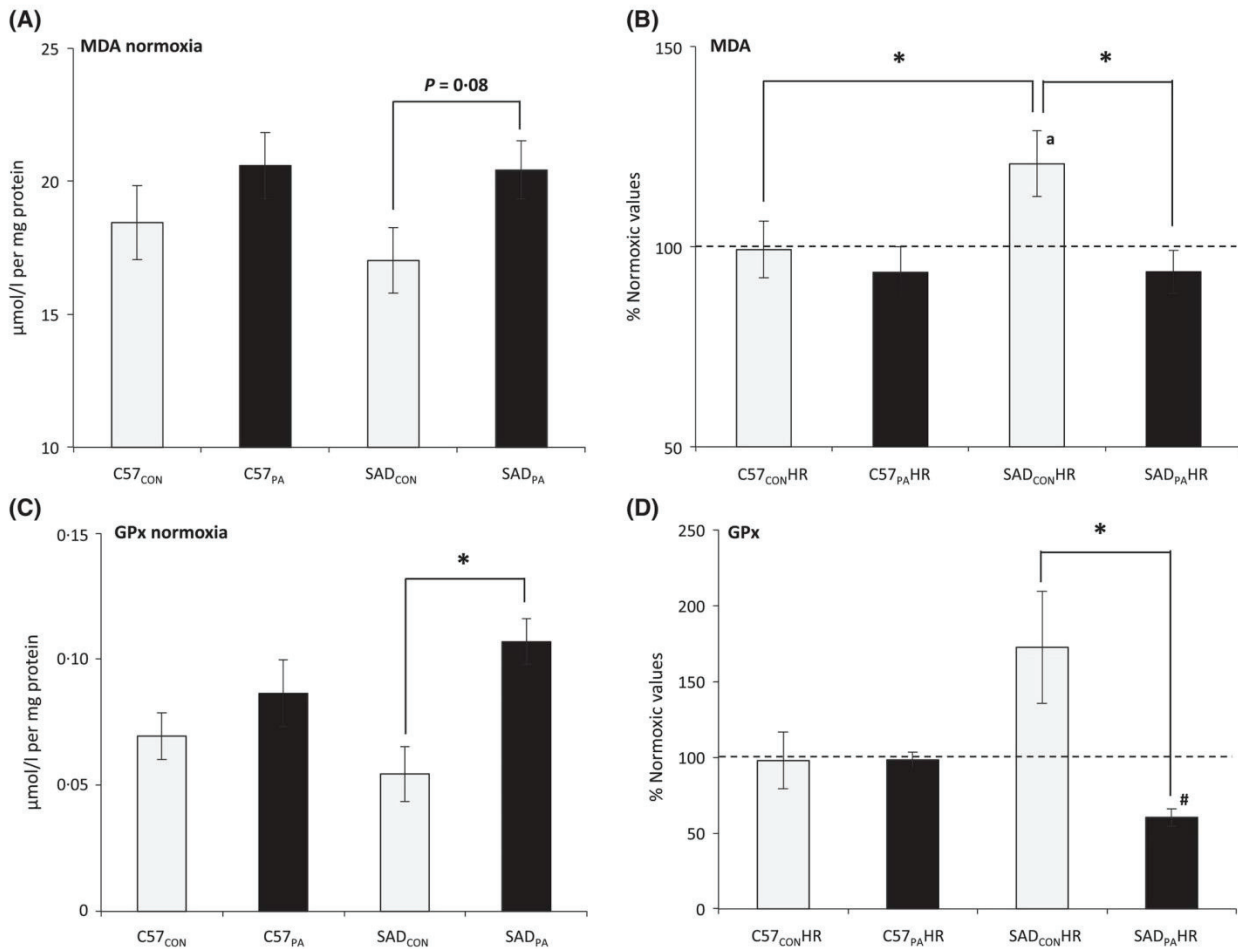


Fig 3. Oxidative stress and antioxidant activity after hypoxia/reoxygenation stress (HR) or not (Nx) in the heart left ventricle of physical activity (PA) or control (CON) C57Bl/6 (C57) and SAD mice. (A) Normoxic baseline values of malondialdehyde concentration (MDA) in the four groups expressed in $\mu\text{mol/l/mg}$ of protein. Values are means \pm SE. (B) MDA variations in response to the H/R stress. MDA was expressed as percentage of the normoxic values. *: $P < 0.05$; a: $P = 0.07$ vs. SAD_{CON}Nx. Values are means \pm SE. (C) Normoxic baseline values of the Glutathione peroxidase (GPx) activity in the four groups expressed in $\mu\text{mol/min/l/mg}$ of protein. *: $P < 0.05$. Values are means \pm SE. (D) GPx activity variations in response to the H/R stress. Results were expressed in percentage of the normoxic values. *: $P < 0.05$; #: $P < 0.05$ vs. SAD_{PA}Nx. Values are means \pm SE.

Interestingly, this study also reports a significant and strong increase both in p-NOS3 staining and in the concentration of NOx in the lungs of PA mice compared to CON mice in response to H/R stress (+37% and +34% respectively; $P < 0.05$). It has recently been shown that low NO bioavailability was responsible for increased vascular adhesion of sickle RBCs (Gutsaeva *et al*, 2014). Our results thus strongly suggest that physical training could improve endothelial function in SCD, as already observed in healthy subjects (Green *et al*, 2004) and in patients with coronary artery disease (Hambrecht *et al*, 2003) after long-term exercise training, and could decrease vascular adhesion. The increase in NOS3 mRNA expression after H/R stress in SAD_{PA} mice but not in SAD_{CON} mice (Fig 2A) suggests that the improvement of pulmonary NO bioavailability in response to physical training is driven, at least partially, by gene expression. Furthermore, because NO was shown to inhibit NF- κ B

(Aslan & Freeman, 2007), it may be possible that physical training could likewise reduce the inflammatory processes leading to endothelial activation, through the improvement of NO bioavailability in sickle SAD mice. This is in agreement with a recent study which showed that physical training in the same mice limited endothelial activation (Aufradet *et al*, 2014).

In SCD, oxidative stress has been shown to contribute to endothelial cell injuries and inflammation, to decrease NO bioavailability and to directly activate the NF- κ B pathway and adhesion molecule expression (Osarogiagbon *et al*, 2000; Nur *et al*, 2011; Chirico & Pialoux, 2012). Moreover, oxidative stress and lower NO bioavailability seem to be involved in the chronic vasculopathy complications observed in SCD subjects (Osarogiagbon *et al*, 2000). Our heart data suggest that physical activity probably reduced the oxidative stress induced by H/R stress in SAD mice. This is supported by

E. Charrin *et al***Table III.** Antioxidant enzymatic activities after hypoxia/reoxygenation stress (HR) or not (Nx) in the heart left ventricle of physical activity (PA) or control (CON) C57Bl/6 (C57) and SAD mice.

	Catalase	SOD
C57 _{CON}		
Nx	1.09 ± 0.06	27.1 ± 2.4
HR	1.09 ± 0.06	27.1 ± 1.3
C57 _{PA}		
Nx	1.13 ± 0.10	27.0 ± 1.6*
HR	1.06 ± 0.04	34.3 ± 4.6
SAD _{CON}		
Nx	1.23 ± 0.04	23.5 ± 2.3
HR	1.29 ± 0.07a	24.8 ± 1.6
SAD _{PA}		
Nx	1.13 ± 0.07	25.2 ± 2.5
HR	1.08 ± 0.07b	25.6 ± 1.4*
C57 vs. SAD	P = 0.08	P < 0.05

Values are means ± SE.

SOD, superoxide dismutase. Catalase is expressed in $\mu\text{mol/l/min/mg}$ protein and SOD in nmol/l/min/mg protein.* $P < 0.05$ vs. C57_{PA}HR; ^a $P = 0.056$ vs. C57_{CON}HR; ^b $P = 0.051$ vs. SAD_{CON}HR.

lower MDA concentrations after H/R stress in SAD_{PA} mice compared to SAD_{CON}. The decreased oxidative stress obtained after H/R stress may be explained by the higher baseline GPx activity in physically active SAD mice compared to SAD_{CON} (Chirico & Pialoux, 2012) which might have neutralized the ROS production. However, as already observed in the literature (Criswell *et al*, 1993), catalase and superoxide dismutase were not increased by physical activity. We observed a trend in higher baseline lipid oxidation in SAD_{PA} mice ($P = 0.08$). This confirms previous studies and may be the result of a physiological adaptation to physical training (Ji, 2007) and could thus explain their higher GPx baseline activity. Indeed, lipid peroxidation by-products have been shown to stimulate antioxidant cell signalling and gene expression (Zhou *et al*, 2001) in order to maintain the oxidant/antioxidant homeostasis in response to acute exercise (Zhou *et al*, 2001; Ji, 2007).

A second hypothesis to explain the diminished oxidative stress by physical activity may be a decreased ROS production, independent of the antioxidant status. Given that physical training in old, diabetic or smoking rat models was associated with a decreased ROS generation (Radák *et al*, 2004), it may be hypothesized that similar adaptations can occur in SAD mice. The decreased haemolysis interpreted from LDH results (Kato *et al*, 2006) supports this hypothesis. Indeed, lower LDH concentrations were observed in SAD_{PA} mice after the H/R stress compared to SAD_{CON} mice. In response to red blood cell lysis, the arginase and cell-free haemoglobin released into the plasma (Gladwin & Sachdev, 2012) are known to be involved in ROS production in SCD via NOS3 uncoupling (Nur *et al*, 2011; Chirico & Pialoux, 2012). Cell-free haemoglobin is also responsible for iron

release into the endothelial cell membrane where it induces endothelial activation along with cell adhesion molecule expression and ROS production (Nur *et al*, 2011). Consequently, if the haemolysis was decreased by physical activity, less cell-free haemoglobin could have been released into the plasma, thus limiting ROS production. We however acknowledge that LDH is an imperfect haemolysis marker (Hebbel, 2011), and as no variations in haematocrit, RBCs and reticulocytes concentrations were observed in PA SAD mice, further studies should focus on the specific effects of physical activity on haemolysis in SCD.

Finally, the lower GPx and catalase activities in SAD_{PA} mice in response to H/R stress may be a consequence of the reduced ROS production in physically active SAD mice. Indeed, a decreased ROS production after H/R stress in SAD_{PA} probably under stimulated the antioxidant enzymes release (Niki, 2009).

Limitations

Our results show that SAD mice trained more than C57 mice. It is unlikely that this physical activity difference is related to different oxidative potential, as the presence of HbS is usually associated with limited physical abilities. Nevertheless, one may not exclude that this different voluntary activity may affect the results obtained in C57_{PA} mice regarding the difference found between SAD and C57 in response to physical training. However, given that our conclusions are based on the differences observed between untrained SAD and C57 in response to H/R stress (pathological effect of the disease) and between trained and untrained SAD (beneficial effect of physical training), it is unlikely that this training load difference would affect the general picture of our results. Further studies, using treadmill protocol, will help to better match training load between groups to definitively exclude this hypothesis.

In conclusion, this study is the first to demonstrate the beneficial effects on oxidative stress of habitual physical activity in response to an H/R stress in SCD mice. The voluntary wheel running protocol was well tolerated by the sickle SAD mice. More importantly, physical activity improved NO bioavailability in response to an H/R stress in the lungs. Cardiac oxidative stress was probably reduced due to an improvement of the antioxidant GPx activity and of a possible reduction of haemolysis. Physical activity in SAD mice is an efficient way to reduce risk factors for vaso-occlusive crises, such as oxidative stress and reduced NO availability. In addition, a similar exercise programme could be a relevant option to control the vascular complications of SCD patients as it was observed that moderate acute exercise did not alter their haemorheologic, oxidative stress and haematological parameters in SCD subjects and may be even beneficial for some haemorheologic parameters (Balayssac-Siransy *et al*, 2011; Waltz *et al*, 2012; Faes *et al*, 2014). Further studies performed on more severe SCD mice models and in SCD patients are needed to test the efficiency and/or the benefits of physical activity in SCD.

Acknowledgements

We thank Pr. Y. Beuzard (INSERM U733, Paris, France) for providing the initial SAD breeding pairs which allowed our laboratory to develop the SAD colony; Y. Campion, A. Dorier, V. Bourgeaux, E. Lemarie and Erytech Pharma for technical assistance and the French Society of Haematology for financial support. The authors have no competing interests, including specific financial interests, relationships, and/or affiliations relevant to the subject matter or materials included in this manuscript.

Authorship contributions

E.A. and C.M. participated in the design of the study; E.C., E.A., A.D., A.R., G.D-S., A.B., and C.F. performed the

experiments; E.C., E.A. and C.M. wrote the manuscript and E.N.C. and V.P. revised the manuscript.

Disclosure of Funding

Some of this work has been funded by the French Society of Haematology.

Conflict of interest disclosure

The authors have no competing interests, including specific financial interests, relationships, and/or affiliations relevant to the subject matter or materials included in this manuscript.

References

- Aslan, M. & Freeman, B.A. (2007) Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radical Biology & Medicine*, **43**, 1469–1483.
- Aufradet, E., Monchanin, G., Oyonno-Enguelle, S., Féasson, L., Messonnier, L., Francina, A., Bezin, L., Serpero, L.D., Gozal, D., Dodogba, M., Wouasssi, D., Banimbeck, V., Djoda, B., Thiriet, P. & Martin, C. (2010) Habitual physical activity and endothelial activation in sickle cell trait carriers. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, **42**, 1987–1994.
- Aufradet, E., Bessaad, A., Alsaïd, H., Schäfer, F., Sigovan, M., De Souza, G., Chirico, E., Martin, C. & Canet-Soulas, E. (2012) In vivo cardiac anatomical and functional effects of wheel running in mice by magnetic resonance imaging. *Experimental Biology and Medicine*, **237**, 263–270.
- Aufradet, E., DeSouza, G., Bourgeaux, V., Bessaad, A., Campion, Y., Canet-Soulas, E., Pialoux, V., Chirico, E.N., Chevrier, A.-M., Godfrin, Y. & Martin, C. (2013) Hypoxia/reoxygenation stress increases markers of vaso-occlusive crisis in sickle SAD mice. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **54**, 297–312.
- Aufradet, E., Douillard, A., Charrin, E., Romdhani, A., De Souza, G., Bessaad, A., Faës, C., Bourgeaux, V., Chirico, E.N., Canet-Soulas, E., Pialoux, V. & Martin, C. (2014) Physical activity limits pulmonary endothelial activation in sickle cell SAD mice. *Blood*, **123**, 2745–2747.
- Balayssac-Siransy, E., Connes, P., Tuo, N., Danho, C., Diaw, M., Sanogo, I., Hardy-Dessources, M.-D., Samb, A., Ballas, S.K. & Bogui, P. (2011) Mild haemorheological changes induced by a moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, **154**, 398–407.
- Balducci, S., Zanuso, S., Nicolucci, A., Fernando, F., Cavallo, S., Cardelli, P., Falluca, S., Alessi, E., Letizia, C., Jimenez, A., Falluca, F. & Pugliese, G. (2010) 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. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **20**, 608–617.
- Bank, N., Aynedjian, H.S., Qiu, J.H., Osei, S.Y., Ahima, R.S., Fabry, M.E. & Nagel, R.L. (1996) Renal nitric oxide synthases in transgenic sickle cell mice. *Kidney International*, **50**, 184–189.
- Chirico, E.N. & Pialoux, V. (2012) Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life*, **64**, 72–80.
- Chirico, E.N., Martin, C., Faës, C., Féasson, L., Oyonno-Enguëllé, S., Aufradet, E., Dubouchaud, H., Francina, A., Canet-Soulas, E., Thiriet, P., Messonnier, L. & Pialoux, V. (2012) Exercise training blunts oxidative stress in sickle cell trait carriers. *Journal of Applied Physiology*, **112**, 1445–1453.
- Connes, P., Machado, R., Hue, O. & Reid, H. (2011) Exercise limitation, exercise testing and exercise recommendations in sickle cell anemia. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **49**, 151–163.
- Criswell, D., Powers, S., Dodd, S., Lawler, J., Edwards, W., Renshler, K. & Grinton, S. (1993) High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, **25**, 1135–1140.
- Davidson, S.R., Burnett, M. & Hoffman-Goetz, L. (2006) Training effects in mice after long-term voluntary exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, **38**, 250–255.
- Faës, C., Balayssac-Siransy, E., Connes, P., Hivert, L., Danho, C., Bogui, P., Martin, C. & Pialoux, V. (2014) Moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia: effects on oxidative stress and endothelial activation. *British Journal of Haematology*, **164**, 124–130.
- Faës, C., Martin, C., Chirico, E.N., Féasson, L., Oyonno-Enguelle, S., Dubouchaud, H., Francina, A., Thiriet, P., Pialoux, V. & Messonnier, L. (2012) Effect of α -thalassaemia on exercise-induced oxidative stress in sickle cell trait. *Acta Physiologica*, **205**, 541–550.
- Gladwin, M.T. & Sachdev, V. (2012) Cardiovascular abnormalities in sickle cell disease. *Journal of the American College of Cardiology*, **59**, 1123–1133.
- Green, D.J., Maiorana, A., O'Driscoll, G. & Taylor, R. (2004) Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *The Journal of Physiology*, **561**, 1–25.
- Gutsaeva, D.R., Montero-Huerta, P., Parkerson, J.B., Yerigenahally, S.D., Ikuta, T. & Head, C.A. (2014) Molecular mechanisms underlying synergistic adhesion of sickle red blood cells by hypoxia and low nitric oxide bioavailability. *Blood*, **123**, 1917–1926.
- Hambrecht, R., Adams, V., Erbs, S., Linke, A., Kränkel, N., Shu, Y., Baither, Y., Gielen, S., Thiele, H., Gummert, J.F., Mohr, F.W. & Schuler, G. (2003) Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, **107**, 3152–3158.
- Hebbel, R.P. (2011) Reconstructing sickle cell disease: a data-based analysis of the 'hyperhemolysis paradigm' for pulmonary hypertension from the perspective of evidence-based medicine. *American Journal of Hematology*, **86**, 123–154.
- Hebbel, R.P., Eaton, J.W., Balasingam, M. & Steinberg, M.H. (1982) Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *Journal of Clinical Investigation*, **70**, 1253–1259.
- Ji, L.L. (2007) Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Experimental Gerontology*, **42**, 582–593.
- Johansson, L.H. & Borg, L.A. (1988) A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical Biochemistry*, **174**, 331–336.
- Kato, G.J., McGowan, V., Machado, R.F., Little, J.A., Taylor, J., Morris, C.R., Nichols, J.S., Wang, X., Poljakovic, M., Morris, S.M. & Gladwin, M.T. (2006) Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*, **107**, 2279–2285.

E. Charrin *et al*

- Kaul, D.K., Liu, X.D., Fabry, M.E. & Nagel, R.L. (2000) Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in transgenic sickle mouse. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, **278**, H1799–H1806.
- Konhilas, J.P., Maass, A.H., Luckey, S.W., Stauffer, B.L., Olson, E.N. & Leinwand, L.A. (2004) Sex modifies exercise and cardiac adaptation in mice. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, **287**, H2768–H2776.
- Misko, T.P., Schilling, R.J., Salvemini, D., Moore, W.M. & Currie, M.G. (1993) A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Analytical Biochemistry*, **214**, 11–16.
- Moraska, A., Deak, T., Spencer, R.L., Roth, D. & Fleshner, M. (2000) Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague–Dawley rats. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **279**, R1321–R1329.
- Niki, E. (2009) Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*, **47**, 469–484.
- Nur, E., Biemond, B.J., Otten, H.-M., Brandjes, D.P. & Schnog, J.-J.B. & Group, the C.S (2011) Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. *American Journal of Hematology*, **86**, 484–489.
- Oberley, L.W. & Spitz, D.R. (1984) Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods in Enzymology*, **105**, 457–464.
- Osarogiabon, U.R., Choong, S., Belcher, J.D., Vercellotti, G.M., Paller, M.S. & Hebbel, R.P. (2000) Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. *Blood*, **96**, 314–320.
- Paglia, D.E. & Valentine, W.N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **70**, 158–169.
- Pritchard, K.A., 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. (2004) Hypoxia-induced acute lung injury in murine models of sickle cell disease. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*, **286**, L705–L714.
- Radák, Z., Chung, H.Y., Naito, H., Takahashi, R., Jung, K.J., Kim, H.-J. & Goto, S. (2004) Age-associated increases in oxidative stress and nuclear transcription factor κ B activation are attenuated in rat liver by regular exercise. *The FASEB Journal*, **18**, 749–750.
- Rees, D.C., Williams, T.N. & Gladwin, M.T. (2010) Sickle-cell disease. *Lancet*, **376**, 2018–2031.
- Trudel, M., Paepe, M.D., Chretien, N., Saadane, N., Jacmain, J., Sorette, M., Hoang, T. & Beuzard, Y. (1994) Sickle cell disease of transgenic SAD mice. *Blood*, **84**, 3189–3197.
- Waltz, X., Hedreville, M., Sinnapah, S., Lamarre, Y., Soter, V., Lemonne, N., Etienne-Julan, M., Beltan, E., Chalabi, T., Chout, R., Hue, O., Mouganel, D., Hardy-Dessources, M.-D. & Connes, P. (2012) Delayed beneficial effect of acute exercise on red blood cell aggregate strength in patients with sickle cell anemia. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **52**, 15–26.
- Zhou, L.Z.-H., Johnson, A.P. & Rando, T.A. (2001) NF κ B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*, **31**, 1405–1416.

Les principaux résultats de cette étude montrent une augmentation des concentrations en métabolites du NO (NOx, Nitrite/nitrate), de l'expression des ARNm codant pour eNOS et de l'expression protéique d'eNOS phosphorylée sur la sérine 1177 quantifiée par immunomarquage dans le poumon des souris entraînées comparées à celle des sédentaires en réponse au stress d'H/R. Ces résultats suggèrent que l'activité physique régulière pourrait donc permettre d'augmenter la biodisponibilité du NO améliorant ainsi la fonction endothéliale pulmonaire des souris SAD, qui se trouve être altérée suite au stress d'H/R (Hebbel, 2014). En parallèle, au niveau cardiaque, nos résultats montrent une diminution de la concentration en MDA, marqueur de peroxydation lipidique en réponse au stress d'H/R. Ces résultats suggèrent que l'activité physique pourrait limiter dans cet organe les dégâts oxydants induits par le stress H/R. Cette adaptation favorable pourrait s'expliquer par l'augmentation, induite par l'activité physique, de l'activité antioxydante de GPx chez les souris SAD en normoxie. Enfin, la concentration plasmatique en LDH, marqueur indirect d'hémolyse, était significativement inférieure chez les SAD entraînées par rapport aux SAD sédentaires après avoir été soumises au stress d'H/R. Ce résultat pourrait ainsi suggérer une hémolyse limitée par l'activité physique et pourrait également contribuer à la diminution du stress oxydant observée chez les SAD entraînées.

L'activité physique régulière semble ainsi être favorable à la fonction pulmonaire et cardiaque des souris drépanocytaires SAD en stimulant le métabolisme du NO, en limitant le stress oxydant et l'hémolyse. Autant de facteurs qui participent à la mise en place d'occlusions vasculaires et aggravent donc la physiopathologie de la maladie. Néanmoins, avec ce mode d'activité physique volontaire, de fortes variabilités intra- et inter-groupes apparaissent (SAD : $28,63 \pm 11,66$ kms/semaine ; C57 : $18,70 \pm 7,31$ kms/semaine) pouvant affecter l'expression des divers marqueurs testés. De plus, comme précisé dans le paragraphe I.D.1., le modèle SAD exprime un phénotype non sévère de la drépanocytose à l'état stable qui pourrait conduire à des

adaptations peu fidèles de la maladie en réponse à l'entraînement physique. Des études complémentaires semblent alors nécessaires afin de vérifier les observations faites et confirmer le caractère protecteur ainsi que l'innocuité de l'entraînement régulier sur des modèles murins plus sévères de la maladie effectuant une charge d'exercice relative semblable.

**Etude 2 : Etude des phénotypes inflammatoire et pro/antioxydant
chez des souris drépanocytaires transgéniques Townes**

Charrin E., Ofori-Acquah S.F., Nader E., Skinner S., Connes P., Pialoux V., Joly. P.,
Martin C.

Publié dans *Blood Cells, Molecules and Diseases* (2016). **62**, 13-21

Les résultats de l'étude 1 fournissent des arguments solides quant aux effets favorables de l'activité physique régulière chez les souris SAD en réponse à un stress vaso-occlusif. Cependant comme développé dans le paragraphe précédent, le phénotype des souris SAD n'est pas suffisamment conforme à celui des patients homozygotes pour répondre à la question des impacts d'un entraînement physique à l'état stable. Depuis quelques décennies, divers modèles murins ont été développés dans le but de reproduire de la façon la plus fidèle possible le phénotype drépanocytaire et d'en étudier les mécanismes. Comme précisé précédemment la souris SAD est un modèle peu sévère de la maladie qui présente peu d'altérations physiologiques visibles à l'état stable. Il est donc nécessaire d'induire un stress (d'hypoxie/réoxygénation par exemple) pour que ces souris développent des caractéristiques de la maladie correspondant à un état de crise vaso-occlusive plutôt qu'à l'état stable. Depuis quelques années, un nouveau modèle murin a vu le jour, le modèle développé par l'équipe du Dr. Tim Townes de l'université d'Alabama (Wu et al., 2006b). La souris Townes exprime exclusivement les chaînes de globines α et β humaines ce qui permet de mimer avec une grande fidélité le phénotype de la drépanocytose. A la naissance, elles disposent également de la chaîne γ -globine humaine qui retarde l'apparition de la maladie (par rapport aux autres modèles murins) et améliore les chances de survie des nouveau-nés (McConnell et al., 2011). Ainsi, la grande fiabilité du modèle Townes conduit à une multiplication des travaux se basant sur ce modèle d'études.

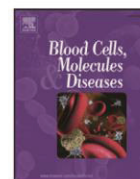
Il est aujourd'hui largement admis que l'inflammation et le stress oxydant ont des fonctions charnières dans la physiopathologie drépanocytaire. Pourtant malgré la recrudescence des travaux conduits chez les souris Townes, aucune étude n'a procédé à une caractérisation phénotypique de ces deux paramètres à l'état basal. Il semble alors intéressant et nécessaire de procéder à un phénotypage global, à l'état basal de ces processus afin de cibler les organes et molécules d'intérêt chez ce modèle de souris transgéniques avant d'appliquer un quelconque traitement. Nous

proposons dans ce travail de faire une analyse hématologique et hémorhéologique à l'état stable ainsi que d'établir un profil moléculaire inflammatoire et pro/antioxydant dans les principaux organes affectés, chez des souris Townes homozygotes drépanocytaires S/S, hétérozygotes A/S et homozygotes saines A/A.



Contents lists available at ScienceDirect

Blood Cells, Molecules and Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bcmd

Inflammatory and oxidative stress phenotypes in transgenic sickle cell mice



Emmanuelle Charrin^{a,b}, Solomon Fiifi Ofori-Acquah^{c,d}, Elie Nader^{a,b}, Sarah Skinner^{a,b}, Philippe Connes^{a,b,e}, Vincent Pialoux^{a,b,e}, Philippe Joly^{a,b,f}, Cyril Martin^{a,b,*}

^a Inter-university Laboratory of Human Movement Science EA7424, Vascular biology and Red Blood Cell Team, University Claude Bernard Lyon 1, University of Lyon, Villeurbanne, France

^b Laboratory of Excellence "GR-Ex", Paris, France

^c Division of Hematology/Oncology, Department of Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15261, USA

^d Center for Translational and International Hematology, Vascular Medicine Institute, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15261, USA

^e Institut Universitaire de France, Paris, France

^f Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Hospital Edouard Herriot, Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Submitted 30 August 2016

Revised 18 October 2016

Accepted 26 October 2016

Available online 28 October 2016

Keywords:

Inflammation

Oxidative stress

Nitric oxide

Sickle cell disease

ABSTRACT

The Townes mouse model of homozygous sickle cell disease (SS) has emerged as the major experimental model for studying pathophysiological mechanisms of human sickle cell disease (SCD). We therefore investigated hematological and hemorheological parameters as well as organ-specific inflammatory and oxidative stress molecular profiles in these animals in steady state conditions. Evidences of SCD-related intravascular hemolysis, impaired red blood cell (RBC) deformability, leukocytosis and altered plasma nitric oxide byproducts (NO_x) level were found in the SS mice. The SS mice have damaged, enlarged and dysfunctional spleen as attested by high AOPP levels, low SOD and GPx activities and low pro-inflammatory cytokines mRNA expression. SS mice exhibited cardiomegaly, high cardiac mRNA levels of proinflammatory markers and low cardiac GPx activity. While lungs did not display any noticeable defects, liver and kidney were particularly sensitive to oxidative stress and inflammation as suggested by high AOPP levels in both organs, elevated renal NF- κ B and TNF- α , and increased hepatic VCAM-1 and IL-1 β . Our data indicate a tissue-specific phenotype regarding oxidative stress and inflammation in SS mice that may help to optimize the development of novel potential drug treatments.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Sickle cell disease (SCD) is the most common genetic disorder, affecting millions of people worldwide. This severe hemoglobinopathy results from the substitution of glutamic acid for valine at the sixth amino acid position in the beta-globin gene [1]. When deoxygenated, mutant hemoglobin (HbS) polymerizes causing the sickling of red blood cells (RBCs) [2]. Fragile and poorly deformable sickle RBCs are responsible for hemorheological alterations [3] leading to typical clinical manifestations including recurrent painful vaso-occlusive crises (VOCs) and severe intravascular hemolytic anemia. Studies of the past decades have demonstrated the key contribution of inflammation and oxidative stress in the pathophysiology of SCD [4,5]. Free heme released into the circulation as a consequence of intravascular hemolysis can intercalate into endothelial cell membranes and cause oxidative and inflammatory damage typical of SCD [6]. Repeated ischemia-reperfusion (I/R) events

occurring during VOC generates reactive oxygen species (ROS) through the activation of xanthine oxidase [7]. Generation of ROS can also result from the strong activation of enzyme complexes such as NADPH oxidase and uncoupled nitric oxide synthase [8]. Thus, oxidative stress results from an imbalance between enhanced production of ROS and low levels of antioxidant defences [9,10]. Indeed, SCD patients have been shown to have reduced concentration and activity of antioxidant systems [11,12]. Moreover, the scavenging of nitric oxide (NO) by ROS inhibits the antioxidant and vasodilatory properties of NO and worsens intravascular hemolysis leading to a vicious circle [4,13]. I/R injury also activates the endothelium and increases the expression of adhesion molecules on endothelial cells [14].

Several murine models have been developed to study the complex pathophysiological mechanisms of SCD [15–19]. The model increasingly being used is the humanized Townes mouse in which the murine α - and β -globin genes have been replaced by the human α -, γ - and either β^A - or β^S -globin genes. A major advantage of the Townes model is that healthy mice expressing normal adult hemoglobin (AA mice) are generated as littermate controls for experiments with SS mice by intercrossing asymptomatic heterozygous AS (sickle cell trait, SCT) mice [5]. In addition, the Townes SS mice display numerous clinical

* Corresponding author at: Interuniversity Laboratory of Human Movement Science (LIBM EA7424), 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 address: cyril.martin@univ-lyon1.fr (C. Martin).

manifestations consistent with the human disease such as severe anemia [20], leukocytosis [21] and multi-organ damages [19]. The Townes SS mice develop pulmonary vascular leakage and edema [22], splenic infarcts and congestion [19], hepatocellular damages [19,23] and glomerulopathy [24]. Hitherto, molecular inflammatory and oxidative stress phenotypes of major organs that are impacted by SCD have not been evaluated in this model. Thus, the present study was designed to analyze the hematological, hemorheological parameters, and inflammatory and oxidative stress molecular responses in several organs affected by SCD in the SS mice.

2. Material & methods

2.1. Animals

We have established a colony of Townes sickle mice in our laboratory originally purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Mouse genotypes were confirmed by PCR. A total of 32 mice aged 12 to 18 weeks old were used and maintained on a 12-hour light-dark cycle with food and water ad libitum. The guidelines from the French Ministry of Agriculture for experimental procedures and the Institute for Laboratory Animal Research (National Academy of Sciences, USA) were followed and the protocol was approved by the regional animal care committee (Rhône-Alpes, France).

2.2. Tissue sampling

Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (50 mg/Kg, Dolethal®, Vétoquinol, Lure, France) and blood was collected by a retro-orbital venipuncture into EDTA tubes for hematological and hemorheological analysis. Mice were sacrificed by exsanguination with a 0.9% NaCl transcardial perfusion for 70 s. Heart, lungs, liver, spleen and kidneys were collected, weighted and immediately frozen in liquid nitrogen for oxidative stress, western blot and qRT-PCR analyses.

2.3. Hematology

An ABX Micros 60 automat (Horiba, Montpellier, France) was used for the following hematological measurements: hematocrit (Hct), red blood cell (RBC) count, hemoglobin concentration, mean corpuscular volume (MCV), RBC distribution width (RDW), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular hemoglobin (MCH), total white blood cell (WBC), lymphocyte, monocyte, granulocyte and platelet count and mean platelet volume (MPV). The percentage of reticulocytes was assessed under a light microscope in a blind fashion on smears stained with brilliant cresyl blue (860867, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) by two independent investigators (BX43 Microscope, Olympus, Tokyo, Japan).

2.4. Hemorheology

RBC deformability was determined at 37 °C at two shear stresses (3 and 30 Pa) by laser diffraction analysis (eckta cytometry), using the Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA MaxSis, RR Mechatronics, Hoorn, The Netherlands). Briefly, 7 µL of oxygenated blood suspension was mixed with 1 mL polyvinylpyrrolidone (PVP; viscosity = 30 cP, RR Mechatronics, Hoorn, The Netherlands) and sheared into the glass Couette system. The diffraction pattern was analyzed by the computer and an elongation index was calculated according to recent recommendations [25]. An increase of the elongation index indicates increased RBC deformability. Whole blood viscosity was determined with a cone plate viscometer (Brookfield DVII+, with CPE40 spindle) at a shear rate of 225 s⁻¹.

2.5. qRT-PCR for antioxidant enzymes mRNA expression

Total mRNA from organs was isolated using RNeasy mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. 500 ng per sample of total mRNA were reverse transcribed to cDNA with the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The reactions were incubated in a thermal cycler for 10 min at 25 °C, 2 h at 37 °C, 5 min at 85 °C and then held at 4 °C. Real-time qPCR analysis was performed on a StepOne Realtime PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All experiments were done in triplicate with TaqMan fast advanced master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Expression level was calculated by the ddCt method and normalized to ribosomal 18S RNA [26]. The TaqMan probes used were: *Heme oxygenase-1* (Hmox-1; Mm00516005_m1), *Nadph quinone oxidoreductase-1* (Nqo-1; Mm01253561_m1), *Superoxide dismutase-1* (Sod-1; Mm01344233_g1).

2.6. qRT-PCR for cytokines mRNA expression

Total mRNA from organs was isolated using Trizol reagent (Tri Reagent LS, Euromedex, Souffelweyersheim, France) according to the manufacturer instructions, purified with DNase I (EN0525, ThermoFisher scientific, Waltham, MA, USA) and concentrated at 80 ng/µL. 1000 ng per sample of total mRNA were reverse transcribed to cDNA with the reverse transcriptase RNase Hminus (Promega, Madison, WI, USA) using oligo (T)15 (Eurogentec, Seraing, Belgium). RT calibration was done in the presence of 80 pg of a synthetic external and non-homologous poly(A) Standard RNA (SmRNA) used to normalise the reverse transcription of mRNAs of biological samples (Morales and Bezin, patent WO2004.092414). Real-time qPCR analysis was performed on a Rotor-Gene Q system (Qiagen, Venlo, Netherlands) by using the Rotor-Gene SYBR® green PCR kit (Qiagen, Venlo, Netherlands). The thermal profiles consisted of 15 min at 95 °C for denaturing followed by 45 cycles of amplifications (15 s at 94 °C for denaturation, 30 s at 58 °C for annealing and 6 s 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); *Interleukine-1β* (IL-1β; NM_008361.3); *Interleukine-6* (IL-6; M24221.1); *Tumor necrosis factor-α* (TNF-α; M13049.1); *Endothelial nitric oxide synthase* (eNOS; NM_008713.4).

2.7. Oxidative stress and antioxidant assessment

Heart, liver, spleen and kidney were homogenized (10%, w/v) in PBS 1X + EDTA 0.5 mM in ice. After centrifugation at 12,000g for 10 min at 4 °C, the supernatant was collected for oxidative stress markers measurements. Homogenate aliquots were stored at -80 °C. Protein concentrations 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 were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Spectrophotometric measurements were performed on TECAN Infinite 2000 plate reader (Männedorf, Switzerland). Results were standardized per mg of total protein.

Advanced oxidation protein products (AOPP) were determined using the method developed by Witko-Sarsat et al. [27] as previously described [28]. AOPP 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 µL of PBS. AOPP activity was expressed as micromoles per liter of chloramine-T equivalents.

Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined by the modified method of Paglia and Valentine [29]. GPx activity represents the rate of NADPH elimination in NADP⁺ after addition of glutathione

reductase, reduced glutathione and NADPH using hydrogen peroxide (H_2O_2) as substrate.

Superoxide dismutase (SOD) activity was determined using the Oberley and Spitz method [30] and represents the degree of inhibition of the reaction between superoxide radicals, produced by a hypoxanthine – xanthine oxidase system, and nitroblue tetrazolium.

Nitrite/Nitrate (NOx) were measured in the plasma using reagents purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA) based on the method of Griess [31]. The sum of nitrite and nitrate in the plasma is considered as an index of NO production.

2.8. Western blotting

Tissue nuclear–cytoplasmic fractionation was conducted using the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. For whole cell extracts, tissues were homogenized in an ice-cold lysis buffer containing Tris Base 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, Triton X-100 0.5% (v/v) and protease inhibitor cocktail (Interchim, Montluçon, France). Homogenates were clarified by centrifugation at 1500g for 4 min at 4 °C. Protein concentrations were determined using the BCA protein assays Kit (Novagen, Darmstadt, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. Samples were prepared in Laemmli buffer (2×) with dithiothreitol (DTT) and boiled for 5 min. About 60 µg of nuclear, cytosolic or whole cell extracts were resolved on 10% Mini-PROTEAN TGX precast SDS-PAGE gels (Biorad, Hercules, CA, USA). Samples were blotted onto nitrocellulose membranes and probed against NF-κB (Santa Cruz, sc-372; 1:500). Appropriate secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase IgG (rabbit) was used for chemiluminescence detection on Kodak BioMax Light Film (Kodak, NY, USA) followed by quantitative imaging system (Image J). To ensure equal loading, blots were normalized to Ponceau S staining (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), which has been validated as a suitable loading control [32,33].

2.9. Statistics

Statistical analyses were performed using Statistica Software (Tulsa, OK, USA). All variables were tested for normality and variance homogeneity. Hematological, hemorheological, oxidative stress and RT-qPCR data were compared using one-way ANOVA followed by planned comparisons and a bilateral Student *t*-test was performed on sickle cells count, HbS percentage and western blot data. A "p-value" inferior to 0.05 was considered statistically significant. The data were expressed as means ± SD.

3. Results

3.1. Hematological and hemorheological profile of Townes mice

Adult Townes SS mice displayed abnormal hematological features regarding red and white blood cell and platelets indices compared to AA and AS mice. Evidence of severe chronic anemia in the SS mice was indicated by decreased hematocrit ($p < 0.05$), lower RBC count ($p < 0.001$) and total hemoglobin ($p < 0.001$) and higher reticulocyte count (10-fold increase, $p < 0.01$) compared to the other mice (Table 1). Mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin was significantly higher in SS mice. The percentage of red cell distribution width was higher in SS ($p < 0.05$) but lower in AS ($p < 0.05$) than in AA littermates. The WBC profile confirmed leukocytosis ($p < 0.001$) reflected by elevated lymphocyte ($p < 0.001$), monocyte ($p < 0.001$) and granulocyte ($p < 0.01$) counts in SS mice (Table 1). Interestingly, SS mice exhibited thrombocytopenia (2-fold decrease vs. AA, $p < 0.001$) while AS had elevated platelet count ($p < 0.001$). In AS mice, mean platelet volume was higher than in AA mice ($p < 0.05$) but lower than in SS mice ($p < 0.001$; Table 1). RBC deformability was significantly lower at both low (3 Pa) and high (30 Pa) shear stresses in SS

Table 1

Hematological and hemorheological parameters in AA, AS and SS mice. Values are presented as means ± SD. RBC, red blood cell count; MCV, mean corpuscular volume; RDW, red cell distribution width; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCH, mean corpuscular hemoglobin; WBC, white blood cell count; MPV, mean platelet volume, EI, elongation index; Pa, Pascal; cP, centipoise. For hematological data: AA ($n = 12$), AS ($n = 6$) and SS ($n = 14$). For hemorheological data: AA ($n = 6$), AS ($n = 7$) and SS ($n = 3$). * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) significant difference compared with AA; † ($p < 0.05$), †† ($p < 0.01$), ††† ($p < 0.001$) significant difference compared with AS.

	AA	AS	SS
HbS (%)	–	31.4 ± 1.6	95.1 ± 2.3†††
Hematocrit (%)	31.8 ± 7.3	34.3 ± 3.4	26.8 ± 5.1††
RBC (10 ⁶ /µL)	9.0 ± 1.0	8.8 ± 0.9	5.7 ± 1.2***†††
Hemoglobin (g/dL)	11.5 ± 0.9	11.0 ± 1.1	6.8 ± 1.3***†††
MCV (fL)	35.2 ± 7.3	38.8 ± 1.2	47.7 ± 5.8***†††
RDW (%)	22.8 ± 8.3	14.3 ± 1.0*	29.3 ± 7.1*
MCHC (g/dL)	33.5 ± 3.8	32.0 ± 0.9	30.7 ± 5.7
MCH (pg)	11.6 ± 0.5	12.4 ± 0.2	14.4 ± 1.6***††
Reticulocytes (%)	4.2 ± 1.5	4 ± 1.8	47.9 ± 14.7***†††
WBC (10 ³ /µL)	7.7 ± 3.9	4.6 ± 1.0	31.8 ± 11.6***†††
Lymphocytes (10 ³ /µL)	6.5 ± 3.5	3.6 ± 0.6	27.5 ± 11.1***†††
Monocytes (10 ³ /µL)	0.5 ± 0.3	0.3 ± 0.2	1.7 ± 0.7***†††
Granulocytes (10 ³ /µL)	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.4	2.5 ± 1.7***††
Platelets (10 ³ /µL)	1718.8 ± 728.7	2805.2 ± 208.6**	743 ± 296.8***†††
MPV (fL)	9.8 ± 3.4	13.0 ± 1.0*	8.3 ± 1.9†††
Sickled cells (%)	–	0.7 ± 0.3	12.1 ± 6.7††
RBC EI at 3 Pa	0.40 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.25 ± 0.03***†††
RBC EI at 30 Pa	0.54 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.46 ± 0.02*††
Blood viscosity at 225 s ⁻¹ (cP)	4.8 ± 0.5	4.8 ± 0.6	5.3 ± 1.4

compared to AA and AS mice but no significant difference in whole blood viscosity at 225 s⁻¹ was observed between the groups (Table 1).

3.2. Macroscopic organ changes in Townes mice

Comparison of major organ weights relative to body weight is shown in Fig. 1. The spleen of SS mice was excessively enlarged; the relative weight was about 8-fold greater than in AA and AS mice. As expected cardiac hypertrophy was found in SS but more surprisingly, the heart weight/body weight ratio was significantly lower in AS compared to AA (Fig. 1). SS mice exhibited hepatomegaly since liver weight/body weight ratio was about 1.5-fold higher than in AA and AS mice. The kidneys of SS mice were ~1.3-fold heavier compared to AA and AS kidneys.

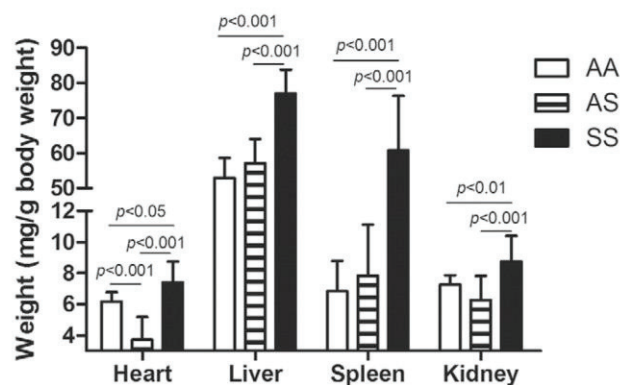


Fig. 1. Relative organ weight in AA, AS and SS mice. Values are presented as means ± SD. AA ($n = 12$), AS ($n = 6$), SS ($n = 14$).

3.3. Antioxidant enzymes mRNA expression

RT-qPCR data revealed a significant higher Hmox1 mRNA expression in the SS liver compared to AA while there was only an upward trend in the heart and no difference in the lung between the two groups (Fig. 2A). Nqo-1 mRNA expression was statistically higher in the liver ($p < 0.05$) and lower in the heart of SS compared to AA, and there was only a downward trend in the SS lung (Fig. 2B). Although Sod-1

mRNA expression was higher in the SS liver compared to AA ($p < 0.001$), there was no difference in the heart and lungs (Fig. 2C).

3.4. Oxidative stress and antioxidants markers activity

AOPP concentrations were not different among the three groups in the heart but were significantly higher in SS liver than in the two other groups (Fig. 3A). Furthermore, SS had higher levels of AOPP in the spleen ($p < 0.01$) and in the kidneys ($p < 0.05$) than AA mice. AOPP concentration in the spleen was not different between SS and AS mice ($p = 0.07$; Fig. 3A). Interestingly, AS had enhanced AOPP concentrations in their kidneys compared to AA littermates ($p < 0.05$; Fig.

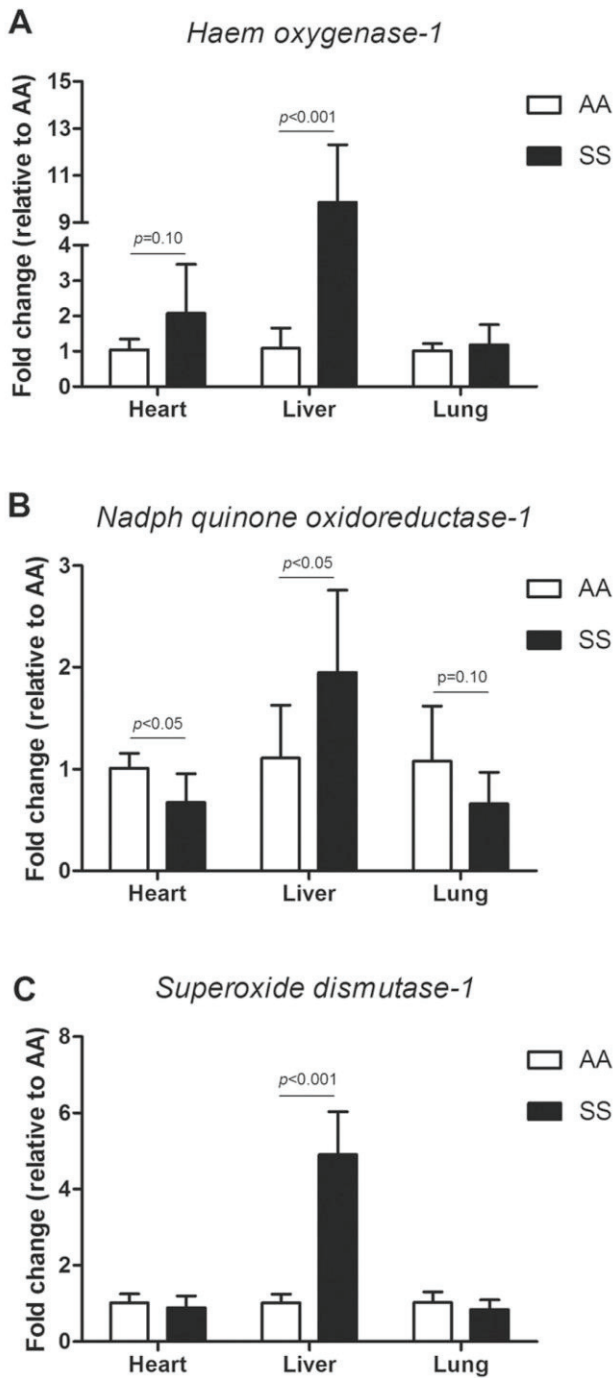


Fig. 2. Antioxidant enzymes mRNA expression in heart, liver and lung of AA and SS mice using RT-qPCR analysis. Values are expressed as means \pm SD. AA (n = 6) and SS (n = 7).

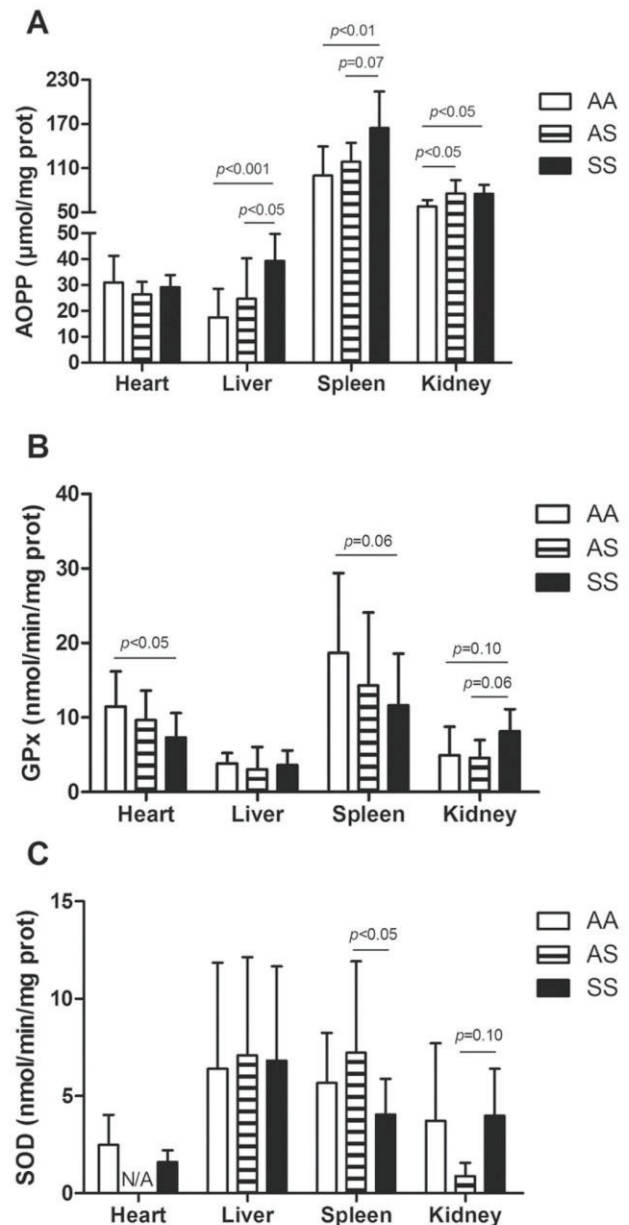


Fig. 3. Oxidative stress markers and antioxidant activities in the heart, liver, spleen and kidney in AA, AS and SS mice. Values are expressed as means \pm SD. AOPP, advanced oxidation protein products; GPx, glutathione peroxidase; SOD, superoxide dismutase. In heart, liver and spleen: AA (n = 12), AS (n = 6) and SS (n = 14). In kidney: AA (n = 6), AS (n = 6) and SS (n = 7).

3A). GPx activity was reduced in the heart of SS mice compared to AA ($p < 0.05$) while there were no significant inter-group differences in the liver (Fig. 3B). GPx activity in the spleen and kidney was not significantly different between SS and AA ($p = 0.06$). SOD activity was not different among groups in the heart and liver (Fig. 3C). In the spleen, SS had lower SOD activity than AS ($p < 0.05$) while no difference was observed between AA and SS.

3.5. Pro-inflammatory cytokines and adhesion molecule mRNA expression

RT-qPCR data showed higher mRNA expression of VCAM-1 ($p < 0.05$) in SS compared to AA and AS in the heart (~2-fold) and in the liver (7.5-fold higher vs AA and 3.4-fold higher vs AS; Fig. 4A). Inversely, in the spleen, SS had lower number of copies than AA mice ($p < 0.05$). There was no significant difference in the kidney and the lung for VCAM-1 mRNA expression. TNF- α mRNA expression was significantly higher in SS compared to AA and AS in the liver (~13-fold increase vs AA and 7-fold increase vs AS) while that difference was significant only between AA and SS in the kidney (~2-fold increase; Fig. 4B). Surprisingly, TNF- α mRNA expression in the spleen was lower in SS than in AA ($p < 0.05$; Fig. 4B). In the lung, the difference was not significantly different between AA and SS ($p = 0.07$; Fig. 4B). IL-1 β mRNA expression was >3 times higher in the liver of SS compared to AA and AS (Fig. 4C). Although there was no difference between AA and SS in the heart, IL-1 β mRNA was more abundant in SS than in AS ($p < 0.05$; Fig. 4C). In the spleen, AS and SS expressed less IL-1 β mRNA than AA. IL-1 β mRNA expression was not significantly different among the three groups in the kidney and in the lung (Fig. 4C). No significant inter-group difference was observed in IL-6 mRNA expression in the different organs (Fig. 4D).

3.6. Nuclear & cytosolic NF- κ B protein expression

As NF- κ B is a redox-sensitive transcription factor that regulates expression of inflammatory cytokines, we measured its expression by Western blot in the heart, liver and kidney. In the heart and liver, comparable levels of NF- κ B expression were observed in nuclear & cytosolic fractions between AA and SS mice (Fig. 5A–B). In contrast, in the kidney of SS mice, nuclear expression of NF- κ B was upregulated compared to AA mice while there was no difference in the cytosolic fraction between the two groups (Fig. 5C).

3.7. Nitric oxide metabolism

eNOS mRNA expression was >2-fold higher in the heart and liver of SS than AA or AS mice (Fig. 6A). The number of copies increased substantially in the SS kidneys compared to AA (~7-fold increase; $p < 0.001$) and AS (~2-fold increase; $p < 0.001$). Additionally, there was a significant increase in eNOS mRNA expression in the AS kidney compared to AA (Fig. 6A). eNOS mRNA level did not differ between the mice in the spleen or in the lung (lung: SS vs AA, $p = 0.09$). Nitric oxide metabolites levels were similar in the plasma of AA compared to AS and SS mice (Fig. 6B).

4. Discussion

This work was initiated to improve our understanding of pathophysiological mechanisms of individual organs affected by SCD by focusing on the inflammatory and oxidative stress-related phenotype in SCD mice.

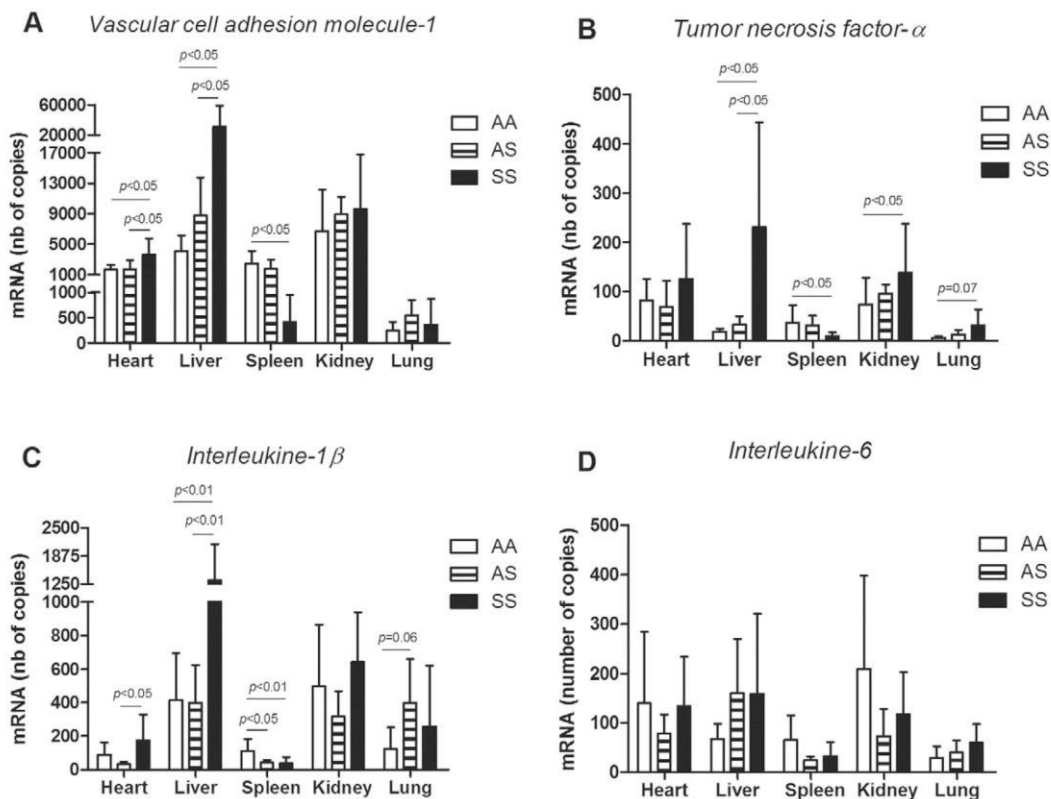


Fig. 4. Adhesion molecule (A), pro-inflammatory cytokines (B, C, D) mRNA expression in heart, liver, spleen, kidney and lung of AA, AS and SS mice using RT-qPCR analysis. Values are expressed as means \pm SD. In heart and liver: AA ($n = 6$), AS ($n = 6$) and SS ($n = 7$). In spleen, kidney and lung: AA ($n = 12$), AS ($n = 6$) and SS ($n = 14$).

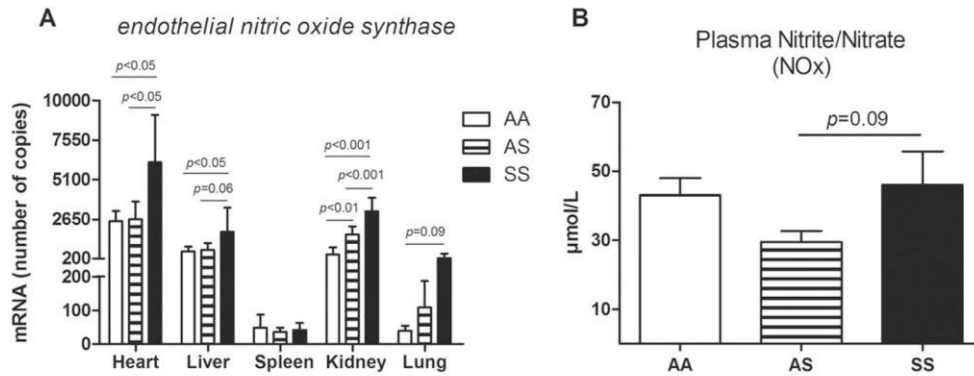


Fig. 5. Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) protein expression in AA and SS mice using western blot analysis. Representative western blot (top) and semi-quantification (bottom) of NF-κB expression in nuclear and cytosolic extracts from heart (A), liver (B) and kidney (C) of AA (n = 6) and SS (n = 6) mice. Values are presented as means ± SD.

Except for platelet count, all baseline hematological data in Townes SS mice were comparable to those usually found in homozygous SCD patients [34]. Evidence of chronic hemolysis is supported by the lower

hematocrit, RBC count, total hemoglobin and higher reticulocyte count with a subsequent increase in MCV, MCH and RDW found in SS mice [14,29–32]. Leukocytosis reflected by elevated lymphocyte [9],

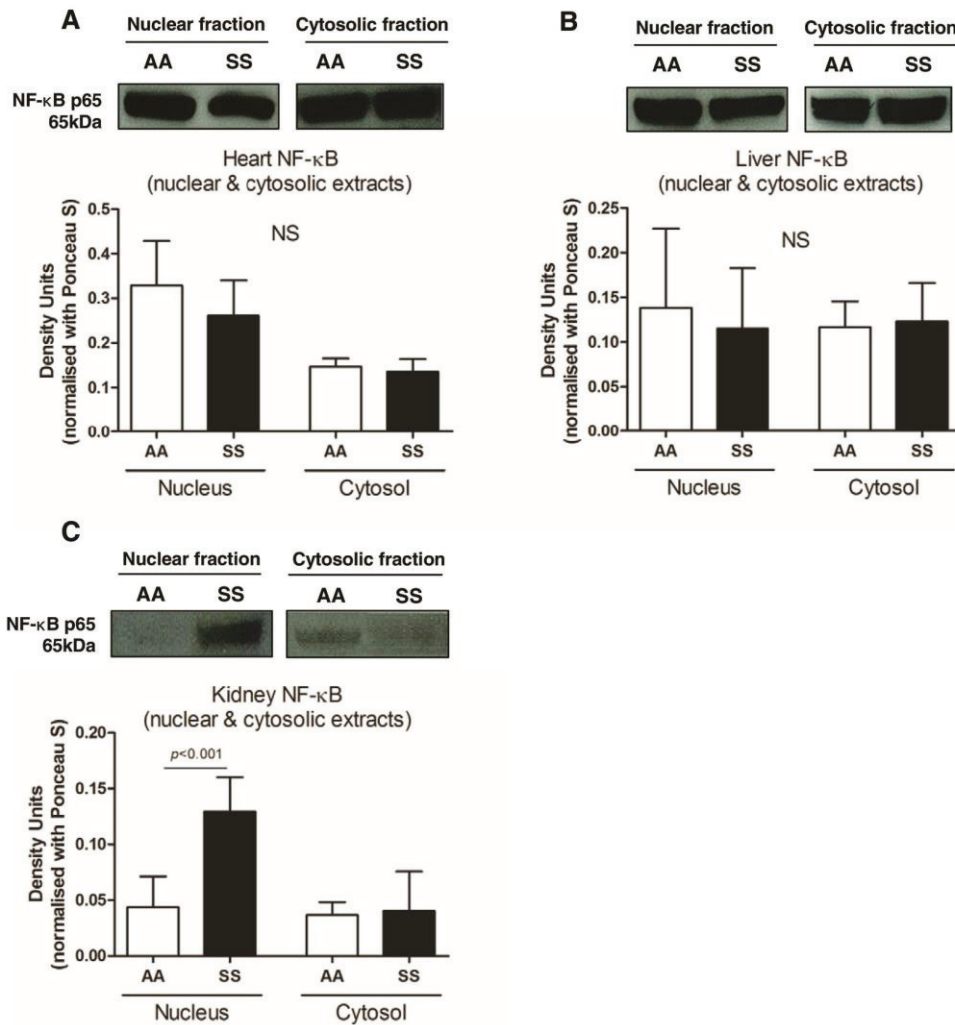


Fig. 6. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA expression in heart, liver, spleen, kidney and lung (A) and plasma NOx (B) of AA and SS mice. eNOS mRNA expression in heart, liver, spleen, kidney and lung of AA (n = 6), AS (n = 6) and SS mice (n = 7) (A). Values are presented as means ± SD.

monocyte [38] and granulocyte counts was found in SS mice as previously described in mild [39–41] and severe sickle mice models [37,39,42] as well as in SCD patients [43–45].

The SS mice had a clear thrombocytopenia which contrasts with the thrombocytosis commonly found in SCD patients [5,34,46]. This may be explained by the presence of splenomegaly in SS mice (Fig. 1) that has been shown to be associated with massive platelet sequestration and subsequent decrease in circulating platelets [47]; a similar finding has previously been reported in sickle Berkeley mice (severe SS phenotype) [48] and in young SS children [49–51]. Increased platelet count in AS Townes mice is in agreement with a similar phenotype observed in the mildly severe SAD model [40,41]. Thus, AS Townes mice could be considered as a murine model of particular relevance to study coagulation alterations occurring in individuals with SCT [52–54].

The poor RBC deformability in SS Townes mice was similar to that described in BERK mice [55] and in homozygous SCD patients [56]. The loss of RBC deformability plays a role in vaso-occlusive events and is correlated with the rate of hemolysis in SCD patients [57]. Although RBC deformability was decreased, blood viscosity was not different between the three mouse groups. At the shear rate used in the present study, blood viscosity is mainly influenced by hematocrit and RBC deformability [58] and the lower hematocrit of SS mice would compensate for the decrease in RBC deformability, leading to normal blood viscosity. This kind of hemorheological compensation has already been reported in homozygous SCD patients [56,59]. Decreased RBC deformability has been shown to be involved in SCD-related glomerulopathy, priapism and leg ulcers in humans [56,60] and in various sickle mouse models [19,61,62]. A primary role for the spleen is the clearance of senescent or altered RBCs. The high sickle RBC turnover rate is likely to release large amount of heme and iron, which promote excessive ROS production [63] reflected by high splenic AOPP levels in SS mice concomitantly to reduced SOD and GPx activities. These latter results confirm those of Natta [64] and Schacter et al. [65] who respectively showed that GPx and SOD levels decreased proportionally to disease severity in homozygous SCD patients. These results suggest a more rapid degradation and/or an inhibition of the antioxidant enzymes possibly from oxygen radicals. However, these findings do not correspond with those of the kidney where SOD and GPx activities tend to be higher in SS than in AS. This organ specificity may be explained by the high susceptibility of the kidney to oxidative stress in SCD [66]. Surprisingly, the lower inflammatory molecules expression in the spleen of SS mice is not consistent with the hypothesis of a chronic, widespread inflammation. However, Szczepanek et al., recently showed a large disorganization of the splenic white pulp with a reduction of defined lymphoid follicles in BERK mice suggesting impaired immune response [37]. Thus, in the present study, the reduction in cytokines expression in SS mouse spleen could be due to altered baseline immunity rather than blunted inflammatory process.

Cardiomegaly in SS mice is a common feature of SCD as a result of chronic anemia [67]. The absence of increased AOPP levels might suggest that the heart is less subjected to oxidative damages in sickle mice at steady state. However, high baseline level of inflammatory markers (VCAM-1, IL-1 β mRNA), low antioxidant enzyme mRNA (NQO-1) and blunted antioxidant enzyme activity (GPx) might be linked to the exacerbated sensitivity to cardiac ischemic injuries recently found in Townes SS mice exposed to hypoxia-reoxygenation bouts [68]. One may speculate that increased cardiac eNOS expression could be a compensatory adaptation supporting the absence of major coronary artery disease described in BERK mice [48] and SCD patients [69].

In accordance with previous observations made in BERK mice [48], pulmonary manifestations appear to be less severe in the Townes SS mice than in SCD patients as no changes in proinflammatory and antioxidant markers expression has been detected.

Hepatomegaly and renal hypertrophy in SS mice were consistent with both murine and human phenotype as consequences of congestion, fibrosis and siderosis in these organs [37,48,70,71]. Persistent

elevated oxidative stress in SS mice as attested by increased AOPP levels may contribute to both the onset and progression of SCD-related proteinuria, glomerulosclerosis, end-stage renal failure as well as liver fibrosis and cirrhosis as seen in other diseases [72,73]. Moreover, as the liver is a major storage organ of iron [74], oxidative stress is potentiated by the reaction of hydrogen peroxide with ferrous iron in the Fenton reaction to produce hydroxyl radical. Thus, one may hypothesize that the liver (but not heart or lung) may develop a compensatory response to counteract the highly damaging ROS production by increasing antioxidant enzyme mRNA expression (Fig. 2). However, elevated mRNA expression does not reflect perfectly antioxidant enzyme activity in the liver [75]. In the Townes SS mice, altered NO metabolism and chronic inflammation suggested by high renal NF- κ B and TNF- α and high hepatic VCAM-1 and IL-1 β may further worsen vascular dysfunction and promote cellular adhesion to the endothelium, hence facilitating occlusion of microvessels in the liver and kidneys [76–79]. Nevertheless, the lack of increased hepatic NF- κ B level is not consistent with hepatic inflammatory cytokine response. It would be interesting to measure the phosphorylated NF- κ B p65 subunit and the total form in future studies since NF- κ B p65 activation occurs in the nucleus, upon its phosphorylation by nuclear kinases [80].

Nitric oxide bioavailability has been shown to mediate and be mediated by both endothelial activation and oxidative stress [4,81]. As eNOS is the enzyme responsible for NO production, the greater mRNA expression in heart, liver and kidney could lead to higher NO production in those organs. This hypothesis is supported by Kaul and colleagues who showed elevated levels of eNOS in β^{S+S} -Anilles and Berk cremaster muscle [82,83] and in NY1DD kidney [70]. In spite of this, authors described altered microvascular reactivity to NO-mediated vasodilators (Acetylcholine and sodium nitroprusside) suggesting NO inactivation or inefficiency [82] which is consistent with the absence of an increase in plasma NOx in our SS mice compared to AA (Fig. 6B). NO may react with the high levels of superoxide anion produced in SCD to form peroxynitrite (ONOO $^-$), a harmful ROS [4]. In this context, Hsu et al., reported a loss of eNOS active form in BERK mice measured by western blot analysis compared to controls [36]. This likely confirms that eNOS levels does not reflect the actual available amount of NO that may be produced since eNOS needs to be phosphorylated to be active [84] and NO might be easily scavenged by superoxide anion. Thus, the quantification of phosphorylated eNOS should be considered as a complementary measure to study NO production and bioavailability in future studies. Finally, it should be acknowledged that nitrites, but not nitrates, were shown to reflect eNOS activity [85], although NOx can be considered as index of NO production. This methodological difference could also explain the lack of higher NOx concentration in SS mice than in AS or AA mice, on the contrary to eNOS mRNA in our studied organs.

In conclusion, Townes SS mice show many similarities of the human disease making them a very useful mouse model for investigating mechanisms of the disease process, and to evaluate the efficacy of novel drugs. Our study describes for the first time the tissue-specific molecular responses to oxidative stress, inflammation and NO in Townes SS mice.

Disclosure of funding

A part of this work has been funded by the Institut Universitaire de France and the National Heart, Lung and Blood Institute (SFOA: R01 HL106192 and U01 HL117721).

Conflict-of-interest disclosure

The authors have no competing interests, including specific financial interests, relationships, and/or affiliations relevant to the subject matter or materials included in this manuscript.

Authors contributions

EC and CM participated in the design of the study; EC, EN and SS performed the experiments; EC, SFOA, and CM analyzed the data and wrote the manuscript. EC, SFOA, VP, PC, PJ and CM wrote and edited the manuscript.

Acknowledgements

We thank Frances Weidert, Bethany Flage and Patrice Del Carmine for technical support.

References

- CA. Marotta, J.T. Wilson, B.G. Forget, S.M. Weissman, Human beta-globin messenger RNA. III. Nucleotide sequences derived from complementary DNA, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 5040–5053.
- S.K. Ballas, N. Mohandas, Pathophysiology of vaso-occlusion, 1996. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 10 1221–1239, [http://dx.doi.org/10.1016/S0889-8588\(05\)70396-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0889-8588(05)70396-8).
- M.R. Clark, N. Mohandas, S.B. Shohet, Deformability of oxygenated irreversibly sickled cells, *J. Clin. Invest.* 65 (1980) 189–196.
- K.C. Wood, L.L. Hsu, M.T. Gladwin, Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance, 2008. *Free Radic. Biol. Med.* 44 1506–1528, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.008>.
- E. Sparkenbaugh, R. Pawlinski, Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease, 2013. *Br. J. Haematol.* 162 3–14, <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12336>.
- G. Balla, G.M. Vercellotti, U. Muller-Eberhard, J. Eaton, H.S. Jacob, Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species, *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* 64 (1991) 648–655.
- E. Nur, B.J. Biemond, H.-M. Otten, D.P. Brandjes, J.-J.B. Schnog, The C.S. Group, Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management, 2011. *Am. J. Hematol.* 86 484–489, <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.22012>.
- M. Aslan, B.A. Freeman, Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease, 2007. *Free Radic. Biol. Med.* 43 1469–1483, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.014>.
- F. Fasola, K. Adedapo, J. Anetor, M. Kuti, Total antioxidants status and some hematological values in sickle cell disease patients in steady state, *J. Natl. Med. Assoc.* 99 (2007) 891–894.
- R.M.W. Hasanato, Zinc and antioxidant vitamin deficiency in patients with severe sickle cell anemia, *Ann. Saudi Med.* 26 (2006) 17–21.
- S.K. Das, R.C. Nair, Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes, 1980. *Br. J. Haematol.* 44 87–92, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.1980.tb01186.x>.
- D.A. Adelekan, D.I. Thumham, A.D. Adekile, Reduced antioxidant capacity in paediatric patients with homozygous sickle cell disease, *Eur. J. Clin. Nutr.* 43 (1989) 609–614.
- E.N. Chirico, V. Pialoux, Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease, 2012. *IUBMB Life* 64 72–80, <http://dx.doi.org/10.1002/iub.584>.
- D.K. Kaul, R.P. Hebbel, Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice, *J. Clin. Invest.* 106 (2000) 411–420.
- M. Trudel, N. Saadane, M.C. Garel, J. Bardakjian-Michau, Y. Blouquit, J.L. Guerin-Kern, P. Rouyer-Fessard, D. Vidau, A. Pachnis, P.H. Roméo, Towards a transgenic mouse model of sickle cell disease: hemoglobin SAD, *EMBO J.* 10 (1991) 3157–3165.
- M.E. Fabry, R.L. Nagel, A. Pachnis, S.M. Suzuka, F. Costantini, 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 (1992) 12150–12154.
- M.E. Fabry, A. Sengupta, S.M. Suzuka, F. Costantini, E.M. Rubin, J. Hofrichter, G. Christoph, E. Mancini, D. Culbertson, S.M. Factor, A second generation transgenic mouse model expressing both hemoglobin S (HbS) and HbS-antilles results in increased phenotypic severity, *Blood* 86 (1995) 2419–2428.
- C. Pászty, C.M. Brion, E. Mancini, H.E. Witkowska, M.E. Stevens, N. Mohandas, E.M. Rubin, Transgenic knockout mice with exclusively human sickle hemoglobin and sickle cell disease, 1997. *Science* 278 876–878, <http://dx.doi.org/10.1126/science.278.5339.876>.
- L.-C. Wu, C.-W. Sun, T.M. Ryan, K.M. Pawlik, J. Ren, T.M. Townes, Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells, 2006. *Blood* 108 1183–1188, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-02-004812>.
- T.M. Townes, Gene replacement therapy for sickle cell disease and other blood disorders, 2008. *ASH Educ. Program Book*, 2008, pp. 193–196, <http://dx.doi.org/10.1182/asheducation-2008.1.193>.
- P. Chantrathammachart, N. Mackman, E. Sparkenbaugh, J.-G. Wang, L.V. Parise, D. Kirchofer, N.S. Key, R. Pawlinski, Tissue factor promotes activation of coagulation and inflammation in a mouse model of sickle cell disease, 2012. *Blood* 120 636–646, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-04-424143>.
- S. Ghosh, F. Tan, S.F. Ofori-Acquah, Spatiotemporal dysfunction of the vascular permeability barrier in transgenic mice with sickle cell disease, 2012. *Anemia* 2012, e582018, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/582018>.
- S. Ghosh, O.A. Adisa, P. Chappa, F. Tan, K.A. Jackson, D.R. Archer, S.F. Ofori-Acquah, Extracellular hemin crisis triggers acute chest syndrome in sickle mice, 2013. *J. Clin. Invest.* 123 4809–4820, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI64578>.
- J. Nguyen, F. Abdulla, C. Chen, P. Nguyen, M. Nguyen, B. Tittle, G. O'Sullivan, J.D. Belcher, G.M. Vercellotti, Phenotypic characterization of the Townes sickle mice, *Blood* 124 (2014) 4916.
- C. Renoux, N. Parrow, C. Faes, P. Joly, M. Hardeman, J. Tisdale, M. Levine, N. Garnier, Y. Bertrand, K. Kebaili, D. Cuzzubbo, G. Cannas, C. Martin, P. Connes, Importance of methodological standardization for the ektacytometric measures of red blood cell deformability in sickle cell anemia, 2016. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 62 173–179, <http://dx.doi.org/10.3233/CH-151979>.
- K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method, 2001. *Methods San Diego Calif.* 25 402–408, <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- V. Witko-Sarsat, M. Friedlander, C. Capeillère-Blandin, T. Nguyen-Khoa, A.T. Nguyen, J. Zingraff, P. Jungers, B. Descamps-Latscha, Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney Int.* 49 (1996) 1304–1313.
- 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, V. Pialoux, Exercise training blunts oxidative stress in sickle cell trait carriers, 2012. *J. Appl. Physiol.* 112 1445–1453, <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.01452.2011>.
- D.E. Paglia, W.N. Valentine, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J. Lab. Clin. Med.* 70 (1967) 158–169.
- L.W. Oberley, D.R. Spitz, Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 457–464.
- J. Sun, X. Zhang, M. Broderick, H. Fein, Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay, 2003. *Sensors* 3 276–284, <http://dx.doi.org/10.3390/s30800276>.
- I. Romero-Calvo, B. Ocón, P. Martínez-Moya, M.D. Suárez, A. Zarzuelo, O. Martínez-Augustín, F.S. de Medina, Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in western blots, 2010. *Anal. Biochem.* 401 318–320, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2010.02.036>.
- J.S. Thacker, D.H. Yeung, W.R. Staines, J.G. Mielke, Total protein or high-abundance protein: which offers the best loading control for western blotting? 2016. *Anal. Biochem.* 496 76–78, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2015.11.022>.
- B. Bain, Morphology of blood cells, *Blood Cells Pract. Guide*, fourth ed. Wiley-Blackwell, Oxford, UK 2006, pp. 61–174.
- L.L. Hsu, H.C. Champion, S.A. Campbell-Lee, T.J. Bivalacqua, E.A. Mancini, B.A. Diwan, D.M. Schimel, A.E. Cochard, X. Wang, A.N. Schechter, C.T. Noguchi, M.T. Gladwin, Hemolysis in sickle cell mice causes pulmonary hypertension due to global impairment in nitric oxide bioavailability, 2007. *Blood* 109 3088–3098, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-08-039438>.
- S.M. Szczepanek, J.T. McNamara, E.R. Secor, P. Natarajan, L.A. Guernsey, L.A. Miller, E. Ballesteros, E. Jellison, R.S. Thrall, B. Andemariam, Splenic morphological changes are accompanied by altered baseline immunity in a mouse model of sickle-cell disease, 2012. *Am. J. Pathol.* 181 1725–1734, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.07.034>.
- N. Wongtong, S. Jones, Y. Deng, J. Cai, K.I. Ataga, Monocytosis is associated with hemolysis in sickle cell disease, 2015. *Hematol. Amst. Neth.* 20 593–597, <http://dx.doi.org/10.1179/1607845415Y.0000000011>.
- J.D. Belcher, C.J. Bryant, J. Nguyen, P.R. Bowlin, M.C. Kielbig, J.C. Bischof, R.P. Hebbel, G.M. Vercellotti, Transgenic sickle mice have vascular inflammation, 2003. *Blood* 101 3953–3959, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-10-3313>.
- E. Aufradet, G. DeSouza, V. Bourgeois, A. Bessaad, Y. Campion, E. Canet-Soulas, V. Pialoux, E.N. Chirico, A.-M. Chevrier, Y. Godfrin, C. Martin, Hypoxia/reoxygenation stress increases markers of vaso-occlusive crisis in sickle SAD mice, 2013. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 54 297–312, <http://dx.doi.org/10.3233/CH-131735>.
- E. Charrin, E. Aufradet, A. Douillard, A. Romdhani, G.D. Souza, A. Bessaad, C. Faes, E.N. Chirico, V. Pialoux, C. Martin, Oxidative stress is decreased in physically active sickle cell SAD mice, 2015. *Br. J. Haematol.* 168 747–756, <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.13207>.
- J.D. Holtzclaw, D. Jack, S.M. Aguayo, J.R. Eckman, J. Roman, L.L. Hsu, Enhanced pulmonary and systemic response to endotoxin in transgenic sickle mice, 2004. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169 687–695, <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200302-2240C>.
- D.R. Boggs, F. Hyde, C. Srodes, An unusual pattern of neutrophil kinetics in sickle cell anemia, *Blood* 41 (1973) 59–65.
- M. Abboud, J. Laver, C.A. Blau, Granulocytosis causing sickle-cell crisis, 1998. *Lancet* 351 959, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)60614-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)60614-9).
- N. Conran, S.T.O. Saad, F.F. Costa, T. Ikuta, Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease, 2007. *Ann. Hematol.* 86 255–261, <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-006-0246-6>.
- J. Leslie, D. Langler, G.R. Serjeant, B.E. Serjeant, P. Desai, Y.B. Gordon, Coagulation changes during the steady state in homozygous sickle-cell disease in Jamaica, 1975. *Br. J. Haematol.* 30 159–166, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.1975.tb00530.x>.
- D.P. Cooney, B.A. Smith, The pathophysiology of hypersplenic thrombocytopenia, 1968. *Arch. Intern. Med.* 121 332–337, <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.1968.03640040026005>.
- E.A. Mancini, C.A. Hillery, C.A. Bodian, Z.G. Zhang, G.A. Luty, B.S. Collier, Pathology of Berkeley sickle cell mice: similarities and differences with human sickle cell disease, 2006. *Blood* 107 1651–1658, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-07-2839>.
- E.C. Rossi, D.W. Westring, A.S. Santos, J. Gutierrez, Hypersplenism in sickle cell anemia, *Arch. Intern. Med.* 114 (1964) 408–412.

- [50] J.M. Topley, D.W. Rogers, M.C. Stevens, G.R. Serjeant, Acute splenic sequestration and hypersplenism in the first five years in homozygous sickle cell disease, *Arch. Dis. Child.* 56 (1981) 765–769.
- [51] O.O. Adeodu, A.D. Adekile, Clinical and laboratory features associated with persistent gross splenomegaly in Nigerian children with sickle cell anaemia, 1990. *Acta Paediatr.* 79 686–690, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.1990.tb11536.x>.
- [52] M.P. Westerman, D. Green, A. Gilman-Sachs, K. Beaman, S. Freels, L. Boggio, S. Allen, R. Schlegel, P. Williamson, Coagulation changes in individuals with sickle cell trait, 2002. *Am. J. Hematol.* 69 89–94, <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.10021>.
- [53] H. Austin, N.S. Key, J.M. Benson, C. Lally, N.F. Dowling, C. Whitsett, W.C. Hooper, Sickle cell trait and the risk of venous thromboembolism among blacks, 2007. *Blood* 110 908–912, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-11-057604>.
- [54] P. Connes, O. Hue, J. Triplette, M.-D. Hardy-Dessources, Blood rheology abnormalities and vascular cell adhesion mechanisms in sickle cell trait carriers during exercise, 2008. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 39 179–184, <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2008-1078>.
- [55] A. Perumbeti, T. Higashimoto, F. Urbinati, R. Franco, H.J. Meiselman, D. Witte, P. Malik, A novel human gamma-globin gene vector for genetic correction of sickle cell anemia in a humanized sickle mouse model: critical determinants for successful correction, 2009. *Blood* 114 1174–1185, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-01-201863>.
- [56] P. Connes, T. Alexy, J. Deterich, M. Romana, M.-D. Hardy-Dessources, S.K. Ballas, The role of blood rheology in sickle cell disease, 2016. *Blood Rev.* 30 111–118, <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2015.08.005>.
- [57] P. Connes, Y. Lamarre, X. Waltz, S.K. Ballas, N. Lemonne, M. Etienne-Julan, O. Hue, M.-D. Hardy-Dessources, M. Romana, Haemolysis and abnormal haemorheology in sickle cell anaemia, 2014. *Br. J. Haematol.* 165 564–572, <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12786>.
- [58] C. Faes, E. Charrin, P. Connes, V. Pialoux, C. Martin, Chronic physical activity limits blood rheology alterations in transgenic SAD mice, 2015. *Am. J. Hematol.* 90 E32–E33, <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.23896>.
- [59] J. Triplette, T. Alexy, M.-D. Hardy-Dessources, D. Mougelen, E. Beltan, T. Chalabi, R. Chout, M. Etienne-Julan, O. Hue, H.J. Meiselman, P. Connes, Red blood cell aggregation, aggregate strength and oxygen transport potential of blood are abnormal in both homozygous sickle cell anemia and sickle-hemoglobin C disease, 2009. *Haematologica* 94 1060–1065, <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2008.005371>.
- [60] K.-C. Cita, L. Bureau, N. Lemonne, M. Billaud, P. Connes, S. Ferdinand, B. Tressières, V. Tarer, M. Etienne-Julan, P. Blanchet, J. Elion, M. Romana, Men with sickle cell anemia and priapism exhibit increased hemolytic rate, decreased red blood cell deformability and increased red blood cell aggregate strength, 2016. *PLoS One* 11, e0154866, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0154866>.
- [61] K.C. Wood, R.P. Hebbel, D.N. Granger, Endothelial cell NADPH oxidase mediates the cerebral microvascular dysfunction in sickle cell transgenic mice, 2005. *FASEB J.* 19 989–991, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.04-3218fje>.
- [62] T.J. Bivalacqua, B. Musicki, L.L. Hsu, M.T. Gladwin, A.L. Burnett, H.C. Champion, Establishment of a transgenic sickle-cell mouse model to study the pathophysiology of priapism, 2009. *J. Sex. Med.* 6 2494–2504, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1743-6109.2009.01359.x>.
- [63] J.D. Belcher, H. Mahaseth, T.E. Welch, L.E. Otterbein, R.P. Hebbel, G.M. Vercellotti, Heme oxygenase-1 is a modulator of inflammation and vaso-occlusion in transgenic sickle mice, 2006. *J. Clin. Invest.* 116 808–816, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI26857>.
- [64] C.L. Natta, L.C. Chen, C.K. Chow, Selenium and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia, *Acta Haematol.* 83 (1990) 130–132.
- [65] L. Schacter, J.A. Warth, E.M. Gordon, A. Prasad, B.L. Klein, Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia, *FASEB J.* 2 (1988) 237–243.
- [66] K.A. Nath, J.P. Grande, J.J. Haggard, A.J. Croatt, Z.S. Katusic, A. Solovey, R.P. Hebbel, Oxidative stress and induction of heme oxygenase-1 in the kidney in sickle cell disease, *Am. J. Pathol.* 158 (2001) 893–903.
- [67] M.T. Gladwin, V. Sachdev, Cardiovascular abnormalities in sickle cell disease, 2012. *J. Am. Coll. Cardiol.* 59 1123–1133, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2011.10.900>.
- [68] F. Tan, S. Ghosh, M. Mosunjac, E. Mancini, S.F. Ofori-Acquah, Original research: diametric effects of hypoxia on pathophysiology of sickle cell disease in a murine model, 2016. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 241 766–771, <http://dx.doi.org/10.1177/1535370216642046>.
- [69] I.A. Mansi, F. Rosner, Myocardial infarction in sickle cell disease, *J. Natl. Med. Assoc.* 94 (2002) 448–452.
- [70] N. Bank, H.S. Aynedjian, J.H. Qiu, S.Y. Osei, R.S. Ahima, M.E. Fabry, R.L. Nagel, Renal nitric oxide synthases in transgenic sickle cell mice, *Kidney Int.* 50 (1996) 184–189.
- [71] K.A. Nath, R.P. Hebbel, Sickle cell disease: renal manifestations and mechanisms, 2015. *Nat. Rev. Nephrol.* 11 161–171, <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2015.8>.
- [72] G. Poli, Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress, 2000. *Mol. Asp. Med.* 21 49–98, [http://dx.doi.org/10.1016/S0098-2997\(00\)00004-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0098-2997(00)00004-2).
- [73] R. Rodrigo, G. Rivera, Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine, 2002. *Free Radic. Biol. Med.* 33 409–422, [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00908-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00908-5).
- [74] Y. Kohgo, K. Ikuta, T. Ohtake, Y. Torimoto, J. Kato, Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload, 2008. *Int. J. Hematol.* 88 7–15, <http://dx.doi.org/10.1007/s12185-008-0120-5>.
- [75] Y. Guo, P. Xiao, S. Lei, F. Deng, G.G. Xiao, Y. Liu, X. Chen, L. Li, S. Wu, Y. Chen, H. Jiang, L. Tan, J. Xie, X. Zhu, S. Liang, H. Deng, How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 40 (2008) 426–436.
- [76] M. Aslan, B.A. Freeman, Oxidant-mediated impairment of nitric oxide signaling in sickle cell disease—mechanisms and consequences, *Cell. Mol. Biol. Noisy-Gd. Fr.* 50 (2004) 95–105.
- [77] K.I. Ataga, C.G. Moore, C.A. Hillery, S. Jones, H.C. Whinna, D. Strayhorn, C. Sohler, A. Hinderliter, L.V. Parise, E.P. Orringer, Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension, 2008. *Haematologica* 93 20–26, <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.11763>.
- [78] J.P. Juncos, J.P. Grande, A.J. Croatt, R.P. Hebbel, G.M. Vercellotti, Z.S. Katusic, K.A. Nath, Early and prominent alterations in hemodynamics, signaling, and gene expression following renal ischemia in sickle cell disease, 2010. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 298 F892–F899, <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00631.2009>.
- [79] J.D. Belcher, C. Chen, J. Nguyen, P. Zhang, F. Abdulla, P. Nguyen, T. Killeen, P. Xu, G. O'Sullivan, K.A. Nath, G.M. Vercellotti, Control of oxidative stress and inflammation in sickle cell disease with the Nrf2 activator dimethyl fumarate, 2016. *Antioxid. Redox Signal.* <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2015.6571>.
- [80] N.D. Perkins, Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function, 2007. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 49–62, <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2083>.
- [81] T.J. Guzik, R. Korbut, T. Adamek-Guzik, Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation, *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 54 (2003) 469–487.
- [82] D.K. Kaul, X.-D. Liu, M.E. Fabry, R.L. Nagel, Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in transgenic sickle mouse, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278 (2000) H1799–H1806.
- [83] D.K. Kaul, X. Liu, H.-Y. Chang, R.L. Nagel, M.E. Fabry, Effect of fetal hemoglobin on microvascular regulation in sickle transgenic-knockout mice, 2004. *J. Clin. Invest.* 114 1136–1145, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI21633>.
- [84] E. Butt, M. Bernhardt, A. Smolenski, P. Kotonis, L.G. Fröhlich, A. Sickmann, H.E. Meyer, S.M. Lohmann, H.H.H.W. Schmidt, Endothelial nitric-oxide synthase (Type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases, 2000. *J. Biol. Chem.* 275 5179–5187, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.7.5179>.
- [85] T. Lauer, M. Preik, T. Rassaf, B.E. Strauer, A. Deussen, M. Feelisch, M. Kelm, Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action, 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 12814–12819, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.221381098>.

Les résultats de cette étude réalisée chez des souris Townes mettent en évidence un large spectre de données hématologiques, hémorhéologiques, inflammatoires et du stress oxydant similaires à celles usuellement trouvées chez l'Homme. Parmi ces facteurs, nous avons observé une baisse importante du nombre de globules rouges, de l'hémoglobine totale et de l'hématocrite ainsi qu'une élévation du taux de réticulocytes chez les souris S/S comparées aux A/A confirmant l'hémolyse caractéristique de la maladie. Une altération de la déformabilité érythrocytaire sans dégradation de la viscosité sanguine chez les S/S suggèrent – avec la baisse de l'hématocrite – la mise en place d'un phénomène compensatoire pour maintenir une viscosité sanguine stable et limiter ainsi les risques d'accidents vaso-occlusifs. Les souris porteuses de la mutation drépanocytaire affichent également une hyperleucocytose à l'état stable reflétant une inflammation chronique et systémique caractéristique du phénotype humain. Au niveau tissulaire, les souris S/S avaient une hypertrophie splénique associée à des concentrations élevées en produits d'oxydation des protéines (AOPP), à des activités antioxydantes de GPx et de SOD amoindries et à une expression ARNm de cytokines pro-inflammatoires réduite attestant de sévères dommages structuraux et fonctionnels de cet organe. Cet aspect phénotypique des souris Townes n'est en revanche pas conforme à celui retrouvé chez l'Homme. La plupart des patients ne développent pas de splénomégalie mais subissent, au contraire, une autospélénectomie due à des infarctus multifocaux et répétés au cours de leur croissance ((Brousse et al., 2014) ; cf. I.B.5.b). A l'état stable, les poumons semblent peu affectés sur le plan inflammatoire mais seraient sévèrement altérés suite à un stress d'hypoxie/réoxygénation (Tan et al., 2016) ou une injection unique d'hème (Ghosh et al., 2013). L'hypertrophie cardiaque, l'expression élevée d'ARNm de cytokines pro-inflammatoires et l'activité GPx défectueuse observées chez les souris S/S à l'état basal suggèrent des dégâts présents mais relativement modérés de cet organe. Des observations semblables sont faites chez les patients drépanocytaires chez lesquels une hypertrophie ventriculaire associée à une hypertension artérielle pulmonaire est souvent diagnostiquée ((Gladwin and Sachdev,

2012) ; cf. I.B.5.c). En revanche, le foie et les reins apparaissent particulièrement sensibles au stress oxydant et à l'inflammation à l'état basal comme le suggèrent l'augmentation des AOPP dans les deux organes, du NF- κ B et TNF- α rénaux et de VCAM-1 et IL-1 β hépatiques. L'expression exacerbée de ces marqueurs inflammatoires et du stress oxydant lorsque les souris sont à l'état stable suggère une participation de ces facteurs au développement de dysfonctions rénales et hépatiques chroniques chez ces animaux.

Bien que non exhaustif, l'établissement de ces profils hématologiques, hémorhéologiques, inflammatoires et du stress oxydant chez la souris Townes met en évidence une variabilité entre les tissus majoritairement affectés par la maladie dans l'expression des différents paramètres physiopathologiques mesurés. Les résultats de cette étude pourraient alors aider à optimiser le développement de nouveaux traitements pharmacologiques potentiels en ciblant spécifiquement une/des molécules d'intérêt dans l'organe touché. De manière plus directe, ce travail sert de base pour les analyses réalisées dans les études 3 et 4 en permettant d'identifier les organes et molécules d'intérêt susceptibles d'être modulés par les deux approches utilisées.

**Etude 3 : Un entraînement physique modéré diminue l'inflammation
chez des souris drépanocytaires Townes**

Charrin E., Dubé J.J., Connes P., Pialoux V., Ghosh S., Ofori-Acquah S.F.*, Martin C*.

Soumis dans *British Journal of Haematology* (2016).

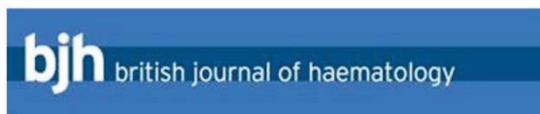
* *place équivalente*

Un programme d'activité physique régulière en roue d'activité semble limiter les effets délétères d'un stress vaso-occlusif dans le poumon et le cœur de souris SAD (cf. Etude 1 et (Aufradet et al., 2014; Faes et al., 2015)). Cependant, comme le met en évidence l'étude 2, la souris Townes apparaît comme un modèle au phénotype drépanocytaire très proche de celui de l'Homme, même à l'état stable contrairement au modèle SAD. Elle développe notamment des troubles hépatiques, rénaux et spléniques sévères à l'état basal. L'objectif, ici, est alors d'établir un bilan, le plus exhaustif possible, des effets de l'entraînement physique sur les principaux organes affectés par la drépanocytose et ce, chez un modèle sévère de la maladie à l'état stable.

Cette 3^{ème} étude a été réalisée dans le cadre d'une mobilité internationale, au sein de l'université de Pittsburgh, Pennsylvanie, dans l'équipe de Pr. Solomon Ofori-Acquah.

Afin de déterminer les valeurs maximales de consommation d'O₂ et de vitesse, pour pouvoir standardiser l'intensité de l'entraînement à 40-60% de cette vitesse, l'ensemble des souris a d'abord participé à un exercice incrémental maximal. Cette intensité a été définie sur la base des travaux existants (Balayssac-Siransy et al., 2011; Waltz et al., 2012) suggérant que l'intensité d'exercice ne devrait pas excéder le seuil anaérobie qui se trouve entre 35 et 60% de $\dot{V}O_2$ max chez les patients drépanocytaires (Anthi et al., 2007; Callahan et al., 2002). A l'issue de 8 semaines d'entraînement sur tapis roulant à raison d'une heure de course par jour, 5 jours/semaine, nous avons procédé à une analyse des paramètres hématologiques, afin de vérifier les adaptations à l'entraînement. Puis, sur la base des données récoltées dans l'étude 2, nous avons analysé des marqueurs de l'inflammation systémique et rénale, du stress oxydant cardiaque et hépatique, de l'hémolyse ainsi que l'aspect structural de la rate en réponse à un entraînement de 8 semaines sur tapis roulant à intensité contrôlée et modérée.

British Journal of Haematology



Moderate exercise training decreases inflammation in transgenic sickle cell mice

Journal:	<i>British Journal of Haematology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Ordinary Papers
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	CHARRIN, Emmanuelle; University Claude Bernard Lyon 1, LIBM EA7424 Vascular Biology and Red Blood Cell Team; University of Pittsburgh, Division of Hematology/Oncology, Department of Medicine Dubé, John; University of Pittsburgh, Division of Endocrinology and Metabolism; Chatham University, Department of Biology Connes, Philippe; University Claude Bernard Lyon 1, LIBM EA7424, Vascular Biology and Red Blood Cell Team Pialoux, Vincent; University Claude Bernard Lyon 1, LIBM EA7424, Vascular Biology and Red Blood Cell Team Ghosh, Samit; University of Pittsburgh, Center for Translational and International Hematology Ofori-Acquah, Solomon; University of Pittsburgh, Division of Hematology/Oncology, Department of Medicine; University of Pittsburgh, Center for Translational and International Hematology Martin, Cyril; University Claude Bernard Lyon 1, LIBM EA7424, Vascular Biology and Red Blood Cell Team
Key Words:	INFLAMMATION, EXERCISE TRAINING, SICKLE CELL DISEASE

SCHOLARONE™
Manuscripts

Moderate exercise training decreases inflammation in transgenic sickle cell mice

Emmanuelle Charrin^{1,2,3}, John J. Dubé^{4,7}, Philippe Connes^{1,2,5}, Vincent Pialoux^{1,2,5}, Samit Ghosh⁶, Solomon F. Ofori-Acquah^{3,6,*}, Cyril Martin^{1,2,*}

¹Interuniversity Laboratory of Human Movement Biology EA7424, Vascular biology and Red Blood Cell team, University Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France

²Laboratory of Excellence “GR-Ex”, Paris, France

³Division of Hematology/Oncology, Department of Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15261, USA

⁴Division of Endocrinology and Metabolism, University of Pittsburgh, PA 15261, USA

⁵Institut Universitaire de France, Paris, France

⁶Center for Translational and International Hematology, Vascular Medicine Institute, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15261, USA

⁷Department of Biology, Chatham University, Pittsburgh, PA 15232

*Equivalent Place

Abstract

Chronic systemic inflammation is a pathophysiological feature of sickle cell disease (SCD). Considering that regular exercise exerts multiple beneficial health effects including anti-inflammatory actions, we investigated whether an 8 week-training treadmill program could minimize the inflammatory state in transgenic sickle cell mice. Exercise training increased the percent of venous oxyhaemoglobin and sharply decreased the percent of carboxyhaemoglobin suggesting that exercise training may limit the proportion of erythrocytes that were deoxygenated in the venous circulation. Exercise training attenuated systemic inflammation as attested by a significant drop in white blood cell (WBC) count and plasma Th1/Th2 ratio. There was reduction in interleukin-1 β and endothelin-1 mRNA expression in trained sickle mice. The spleen/body mass ratio was significantly decreased in trained sickle mice and there was a strong correlation between the magnitude of congestion and the relative spleen mass in all animals (trained and untrained). We conclude that moderate intensity exercise training, without any noticeable complications, may be associated with limited baseline blood deoxygenation and inflammation in sickle cell mice, and reduce sequestration of sickle erythrocytes/congestion in the spleen.

1
2
3 **Key words:** Exercise training, inflammation, sickle cell disease
4
5
6
7

8 **Introduction**
9

10
11 Sickle cell disease (SCD) is a genetic disorder characterised by the production of an
12 abnormal haemoglobin (HbS) that forms intracellular polymers under deoxygenated
13 conditions (Stuart & Nagel, 2004). The ensuing damage to sickle red blood cells (RBCs)
14 results in poor deformability, intravascular haemolysis and occlusion of small vessels (Ballas
15 & Mohandas, 1996). Intravascular haemolysis is accompanied by a release of cell-free HbS
16 and other dangerous molecules into the bloodstream that promote oxidative stress and damage
17 the endothelium (Gladwin & Ofori-Acquah, 2014). The subsequent inflammatory response
18 and endothelial activation triggers the recruitment of adherent leucocytes, as well as RBCs
19 and platelets, on the vascular wall. Increased blood cell adhesion to the endothelium disturbs
20 microvascular blood flow dynamics and accentuates sickle RBCs transit time into the
21 microcirculation (Frenette, 2002). Therefore, homozygous SCD patients exhibit persistent
22 inflammation as indicated by higher circulating levels of inflammatory mediators (Pathare *et*
23 *al*, 2003; Hebbel *et al*, 2004; Hoppe, 2014) resulting in severe organ damage that could lead
24 to the death of the patient (Platt *et al*, 1994; Beers *et al*, 2015).
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 Acute bouts of exercise can cause a temporary increase in inflammatory markers,
44 adhesion molecules and oxidative stress markers (Bartzeliotou *et al*, 2007). The acute
45 inflammatory response is necessary for muscle healing and repair process that initiate
46 performance related adaptations (Toumi & Best, 2003). SCD patients are usually advised to
47 not participate in aggressive sporting activities largely due to fears of causing painful
48 vasoocclusive crisis (Connes *et al*, 2011; van Beers *et al*, 2014; Martin *et al*, 2015). However,
49 several recent studies have demonstrated that short acute submaximal exercises are not
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 associated with clinical events among SCD patients (Balayssac-Siransy *et al*, 2011; Martin *et*
4 *al*, 2015). Importantly, biological responses to exercise were not different among healthy
5 subjects and SCD patients (Balayssac-Siransy *et al*, 2011; Waltz *et al*, 2012; Faes *et al*, 2014).
6
7 Liem and colleagues demonstrated that a maximal cardiopulmonary exercise testing (CPET)
8 did not exacerbate endothelial activation and inflammation in children with SCD (Liem *et al*,
9 2015a). Thus, acute aerobic exercise appears to be a safe intervention for SCD patients.

10
11
12
13
14
15
16 Exercise training promotes anti-inflammatory responses in healthy people (Pedersen &
17 Hoffman-Goetz, 2000) as well as in several cardiovascular, metabolic and respiratory diseases
18 (Adamopoulos *et al*, 2001; Yang & Chen, 2003; Halle *et al*, 2004; Zoppini *et al*, 2006;
19 Fernandes *et al*, 2010; Hamer *et al*, 2012). We have previously described reduced plasma
20 soluble vascular adhesion molecule (sVCAM-1) in physically active sickle cell trait (SCT)
21 individuals at rest and 24hrs after an incremental maximal exercise (Aufradet *et al*, 2010).
22 Furthermore, there is a decrease in pulmonary p-selectin and VCAM-1 expression in SAD
23 sickle cell mice (mild SCD phenotype) following 8-weeks of volunteer aerobic training
24 (Aufradet *et al*, 2014). Hitherto, the potential anti-inflammatory benefits of exercise therapy
25 in SCD have not been investigated. Hence, to test the hypothesis that regular exercise may
26 improve inflammatory state of SCD, we subjected humanised transgenic sickle mouse model
27 expressing exclusively human sickle haemoglobin to an 8-week moderate and individualised
28 exercise training.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 **Material & methods**

46 *Animals*

47
48
49 A colony of Townes sickle mice was established using breeding pairs purchased from the
50 Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Hb genotype and phenotype were confirmed by
51 PCR and Hb gel electrophoresis respectively. Townes mice have both human α - and β -globin
52 genes knocked into the mouse locus, allowing the generation of littermates AA (healthy) and
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 SS (homozygous SCD) by intercrossing AS mice. Mice were used and maintained on a 12-
4
5 hour light-dark cycle with food and water *ad libitum*. The Institutional Animal Care and Use
6
7 Committee (IACUC) at the University of Pittsburgh (Protocol #13102567) approved all mice
8
9 studies.

10 11 12 *Peak exercise protocol*

13
14 Seven-week old SS (n=17) mice were subjected to a 3-day acclimation with progressively
15
16 increased intensity and duration of treadmill exposure (RM Exer-3/6 Open Treadmill with
17
18 Manual Incline; Columbus Instruments). For the peak test, mice ran on an enclosed single-
19
20 lane treadmill (Molecular Enclosed Metabolic Treadmill for Mice; Columbus Instruments)
21
22 attached to an Oxymax/Comprehensive Laboratory Animal Monitoring System (CLAMS;
23
24 Columbus Instruments) that allowed real-time measurements of oxygen consumption ($\dot{V}O_2$)
25
26 and carbon dioxide output ($\dot{V}CO_2$). Mice were fasted for 4 hours with testing being completed
27
28 between 9 and 11 AM. Mice went through a warm-up (5m/min for 5min) before they ran at
29
30 fixed velocities of 9, 12 and 15m/min at 15° inclination for 5 min at each level (Kemi *et al*,
31
32 2002). Thereafter, treadmill speed was increased by 2m/min every two minutes until
33
34 exhaustion, which was defined as the inability to return to treadmill running after 10 s. The
35
36 speed at which $\dot{V}O_2$ reaches a plateau ($\dot{V}O_{2peak}$) is defined as the maximal aerobic speed
37
38 (MAS).
39
40
41
42

43 44 *Treadmill training protocol*

45
46 For the investigations of prolonged training adaptations, mice were rested for 7 days
47
48 following the peak exercise and were then randomised into either treadmill running (trained:
49
50 T-SS) or sedentary control groups (untrained: UT-SS) at 8 weeks of age. Trained mice ran on
51
52 a motorised treadmill (RM Exer-3/6 Open Treadmill with Manual Incline; Columbus
53
54 Instruments) 1h/day, 5d/week for 8 weeks. The training protocol was designed as follows: for
55
56 the first 2 weeks the intensity was fixed at 40% of MAS and running times were increased by
57
58
59
60

1
2
3 15 min every 2-3 days until the animals ran for 1h per day; the intensity was then increased by
4
5 5% every week until it reached 60% MAS. This intensity was maintained during the rest of
6
7 the 8-week training period (Pereira *et al*, 2009). UT-SS mice were exposed to the treadmill
8
9 1d/week and handled daily in a similar fashion as T-SS mice. Mice were exposed to brief
10
11 periods of electric shock if they failed to keep up with the speed of the treadmill. If a mouse
12
13 absolutely refused to run, the animal was removed from the treadmill for the day. Overall, for
14
15 the entire 8-week training period, SS mice ran an average of 48 ± 8 min per session.
16
17

18 19 *Tissue sampling*

20
21 Mice were anaesthetised with isoflurane (Isothesia®, Henry Schein, Dublin, OH, USA) 72hrs
22
23 after the last exercise session and blood was collected by a retro-orbital venepuncture into
24
25 EDTA tubes for haematological analysis. Mice were then sacrificed by cervical dislocation.
26
27 Heart, liver, spleen and kidneys were collected, weighed and immediately frozen in liquid
28
29 nitrogen for oxidative stress, western blot and qRT-PCR analyses.
30
31

32 33 *Whole blood co-oximetry and haematology*

34
35 Total Hb concentration and percent of O₂Hb, COHb and MetHb were measured in venous
36
37 whole blood using a portable CO-oximeter (AVOXImeter 400, ITC). Complete blood count
38
39 (CBC) was assessed using a HemaTrue haematology analyzer (Heska). The percentage of
40
41 reticulocytes was determined by flow cytometry using thiazole-orange staining.
42
43

44 45 *Plasma analysis*

46
47 Freshly collected EDTA blood samples were centrifuged at 1,200 g at room temperature for
48
49 15 min to collect plasma. Total plasma haemoglobin, total plasma haem and LDH activity
50
51 were quantified using colorimetric assay kits (BioAssay Systems, #DIHB-250, #DIHM-250
52
53 and #D2DH-100).
54
55

56 57 *Luminex assay on plasma Th1/Th2 cytokines*

1
2
3 Plasma Th1/Th2 cytokines were determined with the BioPlex Pro™ mouse cytokine,
4 chemokine, and growth factor 23-plex assay (BioRad, Hercules, CA, USA). The assay was
5 performed according to the manufacturer's instructions.
6
7

8 9 10 *qRT-PCR*

11
12 For antioxidant enzymes mRNA level, total mRNA from organs was isolated using RNeasy
13 mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. 500 ng
14 per sample of total mRNA were reverse transcribed to cDNA with the high-capacity cDNA
15 reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the
16 manufacturer's instructions. The reactions were incubated in a thermal cycler for 10 min at
17 25°C, 2 hrs at 37°C 5 min at 85°C and then held at 4°C. Real-time qPCR analysis was
18 performed on a StepOne Realtime PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).
19 All experiments were done in triplicate with TaqMan fast advanced master mix (Applied
20 Biosystems, Foster City, CA, USA). Expression level was calculated by the ddCt method and
21 normalised to ribosomal 18S RNA (Livak & Schmittgen, 2001). The TaqMan probes used
22 were: *Haem oxygenase-1* (Hmox-1; Mm00516005_m1), *Nadph quinone oxidoreductase-1*
23 (*Nqo-1*; Mm01253561_m1), *Superoxide dismutase-1* (*Sod-1*; Mm01344233_g1).
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 For cytokines mRNA level, total mRNA from organs was isolated using Trizol reagent (Tri
41 Reagent LS, Euromedex, Souffelweyersheim, France) according to the manufacturer
42 instructions, purified with DNase I (EN0525, ThermoFisher scientific, Waltham, MA, USA)
43 and concentrated at 80 ng/μL. 1000 ng per sample of total mRNA were reverse transcribed to
44 cDNA with the reverse transcriptase RNase Hminus (Promega, Madison, WI, USA) using
45 oligo (T)15 (Eurogentec, Seraing, Belgium). RT calibration was done in the presence of 80 pg
46 of a synthetic external and non-homologous poly(A) Standard RNA (SmRNA, Synthetic
47 mRNA) used to normalise the reverse transcription of mRNAs of biological samples (Morales
48 and Bezin, patent WO2004.092414). Real-time qPCR analysis was performed on a Rotor-
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Gene Q system (Qiagen, Venlo, Netherlands) by using the Rotor-Gene SYBR[®] green PCR kit
4
5 (Qiagen, Venlo, Netherlands). The thermal profiles consisted of 15 min at 95°C for
6
7 denaturing followed by 45 cycles of amplifications (15 sec at 94°C for denaturation, 30 sec at
8
9 58°C for annealing and 6 sec at 72°C for extension). Results obtained for the targeted mRNAs
10
11 were normalised against the SmRNA. The primer pairs used were: *Interleukine-1 β* (IL-1 β ;
12
13 NM_008361.3); *Interleukine-6* (IL-6; M24221.1); *Tumour necrosis factor- α* (TNF- α ;
14
15 M13049.1); *Endothelin-1* (ET-1; NM_010104.2); *Vascular cell adhesion molecule-1*
16
17 (VCAM-1; NM_011693.2); *Intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1; NM_010493.2); *P-*
18
19 *selectin* (P-sel; NM_011347.2)
20
21
22

23 24 *Oxidative stress and antioxidant assessment*

25
26 Heart and liver were homogenised (10%, w/v) in PBS 1X + EDTA 0.5mM in ice. After
27
28 centrifugation at 12,000 g for 10 min at 4°C the supernatant was collected for oxidative stress
29
30 markers. Homogenate aliquots were stored at -80°C. Protein concentrations were determined
31
32 using the BCA protein assay kit (Novagen, Darmstadt, Germany). All the products used for
33
34 oxidative stress measurements came from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA) and
35
36 spectrophotometric measurements were performed on TECAN Infinite 2000 plate reader
37
38 (Männedorf, Switzerland). Results were standardised per mg of total protein.
39
40

41
42 Witko-Sarsat (Witko-Sarsat *et al*, 1996), Paglia & Valentine (Paglia & Valentine,
43
44 1967), Oberley & Spitz (Oberley & Spitz, 1984) methods were used to determine advanced
45
46 oxidation protein products, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities,
47
48 respectively.
49

50 51 *Histopathology*

52
53 Spleens were harvested and fixed with 10% buffered formalin. Tissue sections were stained
54
55 with haematoxylin/eosin (H&E) and examined using an Olympus AX70 microscope. Images
56
57 were recorded with an Olympus U-CMAD3 DP70 camera and Olympus DP70/DP30 BW
58
59
60

1
2
3 software (version 02.0201.147). ImageJ[®] software with the “H&E colour deconvolution”
4
5 plugin was used to establish vascular congestion score in the spleen. Briefly, this score was
6
7 measured by determining the total tissue area on the original picture while the congested area
8
9 was defined using ImageJ’s automatic threshold on the eosin component, obtained after H&E
10
11 colour deconvolution as previously described (van Putten *et al*, 2010).
12

13 14 15 *Statistics*

16
17 Statistical analyses were performed using Statistica Software (Tulsa, OK, USA). All
18
19 variables were tested for normality and variance homogeneity. Data from Table 1 were
20
21 compared using a two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA). Data between
22
23 untrained and trained SS mice were compared using unpaired Student t-test or Mann-Whitney
24
25 test when appropriate. Pearson’s coefficient was used to test the correlation between relative
26
27 spleen weight and histological congestion score. A *p*-value < 0.05 was considered statistically
28
29 significant. The data were expressed as means ± SD.
30
31

32 33 **Results**

34 35 36 *Aerobic exercise training improves CO-oximetry variables in sickle cell disease.*

37
38 In humans, endurance training is usually associated with a dilutional pseudoanaemia due to an
39
40 expansion of plasma volume – rather than a haemolysis – characterised by a decreased
41
42 haematocrit (Shaskey & Green, 2000). To test the hypothesis that chronic aerobic exercise
43
44 would result in similar improvements in a rodent model of sickle cell disease, we performed a
45
46 complete blood count as well as haemolytic markers assays in SS-mice following 8-weeks of
47
48 forced treadmill running. As shown in **Table 1**, prior to the training, $\dot{V}O_2$ peak and maximal
49
50 aerobic speed were similar in all SS mice. These values are significantly lower (-17% and -
51
52 57% respectively) than those usually obtained in healthy AA mice in our laboratory
53
54 (**Supplementary Table 1**). After 8 weeks of training, body weight, heart weight, platelets and
55
56
57
58
59
60

1
2
3 RBC indices were not affected in SS mice (**Table 1**). However, in T-SS, haematocrit was
4 significantly lower while the percent of venous oxyhaemoglobin was almost 2-fold higher
5 compared to UT-SS (**Figure 1A-B**, both $p < 0.05$). Exercise training led to a 3-fold decrease in
6 the percent of carboxyhaemoglobin in sickle mice (**Figure 1C**). Total plasma haem, total
7 plasma haemoglobin and circulating LDH were not significantly reduced in trained compared
8 to untrained SS mice (-5%, -7% and -7% respectively, $p > 0.05$; **Table 1**). Together these data
9 suggest that exercise training modulates haematocrit, venous blood deoxygenation and
10 carboxyhaemoglobin levels in sickle mice.
11
12

13
14
15
16
17
18
19
20
21 *Aerobic exercise training improves systemic and tissue-specific oxidative stress and*
22 *inflammation in sickle cell disease.*
23

24 Sickle cell disease is associated with increased oxidative stress (Wood & Granger, 2007;
25 Chirico & Pialoux, 2012) and chronic inflammation (Sparkenbaugh & Pawlinski, 2013;
26 Hoppe, 2014). To test the hypothesis the chronic aerobic exercise would improve these
27 deleterious pathways, we measured tissue specific markers of oxidative stress and
28 inflammation. In the heart, advanced oxidation protein products (AOPP) levels were lower in
29 trained SS than in untrained littermates whereas no change in antioxidant enzyme mRNA
30 expression or activity were observed between the two groups (**Table 2**). In liver, haem
31 oxygenase-1 (HO-1) mRNA expression was lower in the trained group while there was no
32 significant difference for the other oxidative stress markers between the two groups. The 8-wk
33 training decreased the WBC count by more than 30% in SS mice (**Figure 2A**, $p < 0.05$) and
34 this change was reflected by a corresponding lower lymphocytes count (**Table 1**, $p < 0.05$).
35 Remarkably, five of the eight calculated Th1/Th2 ratios were reduced in trained mice
36 compared to untrained SS mice (**Figure 2B**). After 8 weeks of training, SS mice presented a
37 2-fold and a 3-fold decrease in IL-1 β and endothelin-1 mRNA expression in the kidneys,
38 respectively (**Figure 3A**). However, no change was detected in adhesion molecules mRNA
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 expression (**Figure 3B**). Together these data support the hypothesis that moderate exercise
4
5 training may attenuate inflammatory process in sickle mice.
6
7

8 ***Moderate training limits splenic congestion***

9
10 The spleen/body mass ratio was substantially reduced in the trained group (**Table 1**).
11
12 Histology revealed a less congested splenic vasculature (Figure 4A) suggested by a downward
13
14 trend ($p=0.06$) in the spleen congestion score in T-SS mice (**Figure 4B**). The magnitude of
15
16 congestion in all animals was positively correlated ($p<0.01$) with the relative spleen mass
17
18 (**Figure 4C**). Finally, the 8-wk training did not affect pro-inflammatory markers mRNA
19
20 expression in the spleen of SS mice (**data not shown**). Together these data suggest that
21
22 exercise training may limit splenic hypertrophy and congestion in sickle mice.
23
24
25

26 **Discussion**

27
28
29 The overall goal of this study was to determine the impact of chronic aerobic exercise
30
31 training on *haematologic* variables, oxidative stress, and inflammation in a severe mouse
32
33 model of sickle cell disease (SCD). Our novel results provide evidence of multifocal benefits
34
35 of exercise training in SCD mice by *i*) limiting resting blood deoxygenation, *ii*) reducing
36
37 systemic and organ inflammation, *iii*) decreasing carboxyhaemoglobin levels, and *iv*)
38
39 attenuating spleen congestion. These data are highly impactful given the fact that individuals
40
41 with SCD are prone to multiorgan damage (Banerjee *et al*, 2001; Al-Salem, 2011; Nath &
42
43 Hebbel, 2015) and are generally discouraged from engaging in vigorous physical activity
44
45 (Connes *et al*, 2011; Martin *et al*, 2015). Our data provide evidence to support the notion that
46
47 moderate aerobic exercise may result in systemic as well as tissue specific improvements in
48
49 pathways known to adversely affect patients with SCD.
50
51
52

53
54 Aerobic capacity is reduced in humans with SCD. Indeed, previous findings reported
55
56 exercise limitation in SCD patients during a 6-min walk test (Gordeuk *et al*, 2011; Waltz *et al*,
57
58
59
60

1
2
3 2013) as well as submaximal (McConnell *et al*, 1989; Hackney *et al*, 1997) and maximal (van
4 Beers *et al*, 2014; Liem *et al*, 2015b) exercise testing. Reduced aerobic fitness of SCD
5 patients is attributed to chronic anaemia (van Beers *et al*, 2014), as well as impaired
6 musculoskeletal function (van Beers *et al*, 2014; Ravelojaona *et al*, 2015) and cardiovascular
7 and respiratory limitations (Callahan *et al*, 2002; Connes *et al*, 2011). In agreement with these
8 data, we observed reductions in peak fitness in the murine model of sickle cell disease. These
9 data, in conjunction with the other haematologic variables reported, support the validity of
10 using this particular model in the examination of exercise interventions in sickle cell disease.
11
12
13
14
15
16
17
18
19

20
21 Exercise training is a fundamental lifestyle intervention known to improve
22 cardiovascular fitness (Dimmeler & Zeiher, 2003), reduce oxidative stress (Ji *et al*, 2006), and
23 decrease markers of inflammation (Gleeson, 2007). However, exercise training studies in
24 sickle cell patients are limited due to the potential for crises associated with physical activity
25 (Connes *et al*, 2011; Martin *et al*, 2015). Nonetheless, in our experiment, the moderate-
26 intensity exercise regimen we imposed was well tolerated by the SS mice and induced a
27 normal physiological haemodilution response, as suggested by the lower haematocrit without
28 any change in RBC count or total Hb after training (Brun, 2002). More intriguingly, exercise
29 training increased the fraction of venous oxygen-saturated haemoglobin at rest in the sickle
30 mice when it should not vary with training status in resting conditions (Sullivan *et al*, 1988).
31 We speculate that the increase in venous blood oxygenation would interfere with HbS
32 polymerization and limit RBC sickling in the trained SS mice. Together these data suggest
33 that decrease in both haematocrit and resting venous blood deoxygenation induced by
34 exercise may result in lower risk of RBC sickling in SCD.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52
53 Haemolysis is a major component of SCD resulting in increased oxidative stress, NO
54 scavenging and inflammation. Although accurate assessment of haemolysis is challenging and
55 the validity of most of the biomarkers is controversial (Hebbel, 2011; Kato *et al*, 2013),
56
57
58
59
60

1
2
3 carboxyhaemoglobin has been shown to be a reliable haemolytic index given that it generated
4
5 from endogenous carbon monoxide (CO) that is derived solely from haem catabolism (Engel
6
7 *et al.*, 1971). Therefore, the decrease in venous proportion of carboxyhaemoglobin
8
9 accompanied by the slight, but not significant, reduction in total plasma Hb, total plasma
10
11 haem and LDH activity as well as by lower hepatic HO-1 mRNA expression support our
12
13 contention that moderate exercise training attenuated intravascular haemolysis in the SS mice.
14
15 In agreement with this reasoning, we previously found lower LDH activity after hypoxia-
16
17 reoxygenation stimulus in physically active sickle SAD mice compared to untrained
18
19 littermates (Charrin *et al.*, 2014). Furthermore, blunted haemolysis could limit the extent of the
20
21 oxidative stress damage (Chirico & Pialoux, 2012) as evidenced in the present study by lower
22
23 AOPP levels in the heart. Together these data suggest that exercise may attenuate haemolysis,
24
25 but additional studies using more direct haemolytic markers are required to confirm that
26
27 statement.
28
29
30

31
32 Compared to healthy individuals, SCD patients suffer from leucocytosis and high
33
34 resting concentrations of pro-inflammatory cytokines (Hoppe, 2014). Nevertheless, previous
35
36 work showed a decrease in IL-18/IL-10 ratio (cytokines secreted by Th1 and Th2 subtype T-
37
38 cells, respectively) in trained diabetic patients suggesting a shift towards an anti-inflammatory
39
40 function of chronic exercise (Kadoglou *et al.*, 2007). Similarly, in multiple sclerosis patients,
41
42 Th1 type response was reduced with no changes in Th2 type response after an 8-wk exercise
43
44 training (Golzari *et al.*, 2010). The reduced WBC count and Th1/Th2 ratios in the trained SS
45
46 mice in this study may thus indicate an anti-inflammatory role of moderate endurance training
47
48 in SCD. Reduced systemic inflammation by exercise training may further limit organ-specific
49
50 inflammation, especially in the kidney as suggested by lower renal IL-1 β and ET-1 mRNA
51
52 expression in the trained SS mice. We speculate that moderate training might prevent renal
53
54 injury in sickle mice as ET-1 and IL-1 β have been widely shown to contribute to the
55
56
57
58
59
60

1
2
3 progression of SCD kidney disease (Furuichi *et al*, 2006; Tharoux, 2011; Heimlich *et al*,
4 2016). Lowering of HO-1 expression in the liver of trained SS mice provides complementary
5 evidence of the anti-inflammatory impact of chronic exercise as raised HO-1 promotes
6 metabolic inflammation in obese mice and humans (Jais *et al*, 2014).
7
8
9

10
11
12 Hypersplenism, characterised by splenomegaly with anaemia and thrombocytopenia,
13 results from recurrent acute sequestration of RBCs in the spleen and is associated with an
14 increased morbidity and mortality in SCD children (Topley *et al*, 1981). Remarkably,
15 histological data from the current study reveal that moderate endurance training reduced
16 splenic congestion and limited its enlargement in sickle mice. In line with this finding, the
17 severity of spleen congestion was lower in sickle mice after 3-months on high protein diet
18 than in normal diet sickle mice even though spleen weight did not change (Manci *et al*, 2014).
19 One may speculate that the increased resting venous oxygen saturation observed in SS mice
20 and the associated lower risk of HbS polymerization subsequently decreased the amount of
21 sickle RBC trapped into the splenic microcirculation, attenuating congestion. Despite this, the
22 absence of changes in cytokines gene expression in SS spleen may suggest that exercise
23 training failed to improve spleen function, as Szczepanek *et al*. recently showed that splenic
24 white pulp disorganization and reduction of defined lymphoid follicles are associated with an
25 impaired immune response in BERK mice (Szczepanek *et al*, 2012). Together these data point
26 to an exercise-induced improvement in spleen structure and size that might limit the risk of
27 potentially fatal splenic rupture.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47 In conclusion, we have identified that moderately intense exercise training is a major
48 mitigating factor of intravascular haemolysis, systemic and renal inflammation and splenic
49 congestion in homozygous SCD mice. These findings strengthen the previous evidence that
50 exercise training, with appropriate safety considerations, could serve as a potential therapeutic
51 option for a large number of patients worldwide.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Author contributions: EC, JD, VP, PC, SFOA, CM participated to the design of the study, EC, SG, performed the experiments, EC, JD, VP, PC, SFOA, CM wrote the manuscript.

Acknowledgements: This study was conducted with research funding from Institut Universitaire de France (PC, VP) and the National Heart, Lung and Blood Institute (SFOA: R01 HL106192 and U01 HL117721). We thank Frances Weidert, Bethany Flage, for technical support.

References

- Adamopoulos, S., Parissis, J., Kroupis, C., Georgiadis, M., Karatzas, D., Karavolias, G., Koniavitou, K., Coats, A.J.S. & Kremastinos, D.T. (2011) Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. *European Heart Journal*, **22**, 791–797.
- Al-Salem, A.H. (2011) Splenic Complications of Sickle Cell Anemia and the Role of Splenectomy. *ISRN Hematology*, **2011**, Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3200071/>.
- Aufradet, E., Douillard, A., Charrin, E., Romdhani, A., De Souza, G., Bessaad, A., Faes, C., Bourgeaux, V., Chirico, E.N., Canet-Soulas, E., Pialoux, V. & Martin, C. (2014) Physical activity limits pulmonary endothelial activation in sickle cell SAD mice. *Blood*, **123**, 2745–2747.
- Aufradet, E., Monchanin, G., Oyonno-Enguelle, S., Féasson, L., Messonnier, L., Francina, A., Bezin, L., Serpero, L.D., Gozal, D., Dodogba, M., Wouassi, D., Banimbeck, V., Djoda, B., Thiriet, P. & Martin, C. (2010) Habitual Physical Activity and Endothelial Activation in Sickle Cell Trait Carriers. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, **42**, 1987–1994.
- Balayssac-Siransy, E., Connes, P., Tuo, N., Danho, C., Diaw, M., Sanogo, I., Hardy-Dessources, M.-D., Samb, A., Ballas, S.K. & Bogui, P. (2011) Mild haemorheological changes induced by a moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, **154**, 398–407.
- Ballas, S.K. & Mohandas, N. (1996) Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **10**, 1221–1239.
- Banerjee, S., Owen, C. & Chopra, S. (2001) Sickle cell hepatopathy. *Hepatology*, **33**, 1021–1028.

- 1
2
3 Bartzeliotou, A.I., Margeli, A.P., Tsironi, M., Skenderi, K., Bacoula, C., Chrousos, G.P. &
4 Papassotiropoulos, I. (2007) Circulating levels of adhesion molecules and markers of endothelial
5 activation in acute inflammation induced by prolonged brisk exercise. *Clinical Biochemistry*,
6 **40**, 765–770.
7
- 8 van Beers, E.J., van der Plas, M.N., Nur, E., Bogaard, H.-J., van Steenwijk, R.P., Biemond, B.J. &
9 Bresser, P. (2014) Exercise tolerance, lung function abnormalities, anemia, and cardiothoracic
10 ratio in sickle cell patients. *American Journal of Hematology*, **89**, 819–824.
11
- 12 Beers, E.J. van, Yang, Y., Raghavachari, N., Tian, X., Allen, D.T., Nichols, J.S., Mendelsohn, L.,
13 Nekhai, S., Gordeuk, V.R., Taylor, J.G. & Kato, G.J. (2015) Iron, Inflammation, and Early
14 Death in Adults With Sickle Cell Disease. *Circulation Research*, **116**, 298–306.
15
- 16 Brun, J.-F. (2002) Exercise hemorheology as a three acts play with metabolic actors: is it of clinical
17 relevance? *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **26**, 155–174.
18
- 19 Callahan, L.A., Woods, K.F., Mensah, G.A., Ramsey, L.T., Barbeau, P. & Gutin, B. (2002)
20 Cardiopulmonary Responses to Exercise in Women with Sickle Cell Anemia. *American*
21 *Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **165**, 1309–1316.
22
- 23 Charrin, E., Aufradet, E., Douillard, A., Romdhani, A., Souza, G.D., Bessaad, A., Faes, C., Chirico,
24 E.N., Pialoux, V. & Martin, C. (2014) Oxidative stress is decreased in physically active sickle
25 cell SAD mice. *British Journal of Haematology*, n/a-n/a.
26
- 27 Chirico, E.N. & Pialoux, V. (2012) Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease.
28 *IUBMB Life*, **64**, 72–80.
29
- 30 Connes, P., Machado, R., Hue, O. & Reid, H. (2011) Exercise limitation, exercise testing and exercise
31 recommendations in sickle cell anemia. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **49**,
32 151–163.
33
- 34 Dimmeler, S. & Zeiher, A.M. (2003) Exercise and cardiovascular health: get active to ‘AKTivate’
35 your endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, **107**, 3118–3120.
36
- 37 Engel, R.R., Rodkey, F.L. & Krill, C.E. (1971) Carboxyhemoglobin Levels as an Index of Hemolysis.
38 *Pediatrics*, **47**, 723–730.
39
- 40 Faes, C., Balayssac-Siransy, E., Connes, P., Hivert, L., Danho, C., Bogui, P., Martin, C. & Pialoux, V.
41 (2014) Moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia: effects on oxidative
42 stress and endothelial activation. *British Journal of Haematology*, **164**, 124–130.
43
- 44 Fernandes, J.L., Jr, C.V.S., Toledo, F., Hunziker, M.F., Zamperini, A., Teo, F.H., Oliveira, R.T.,
45 Blotta, M.H., Rondon, M.U. & Negrão, C.E. (2010) Acute and chronic effects of exercise on
46 inflammatory markers and B-type natriuretic peptide in patients with coronary artery disease.
47 *Clinical Research in Cardiology*, **100**, 77–84.
48
- 49 Frenette, P.S. (2002) Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Current*
50 *Opinion in Hematology*, **9**, 101–106.
51
- 52 Furuichi, K., Wada, T., Iwata, Y., Kokubo, S., Hara, A., Yamahana, J., Sugaya, T., Iwakura, Y.,
53 Matsushima, K., Asano, M., Yokoyama, H. & Kaneko, S. (2006) Interleukin-1-dependent
54 sequential chemokine expression and inflammatory cell infiltration in ischemia-reperfusion
55 injury. *Critical Care Medicine*, **34**, 2447–2455.
56
- 57 Gladwin, M.T. & Ofori-Acquah, S.F. (2014) Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. *Blood*,
58 **123**, 3689–3690.
59
60

- 1
2
3 Gleeson, M. (2007) Immune function in sport and exercise. *Journal of Applied Physiology*, **103**, 693–
4 699.
- 5
6 Golzari, Z., Shabkhiz, F., Souidi, S., Kordi, M.R. & Hashemi, S.M. (2010) Combined exercise training
7 reduces IFN- γ and IL-17 levels in the plasma and the supernatant of peripheral blood
8 mononuclear cells in women with multiple sclerosis. *International Immunopharmacology*, **10**,
9 1415–1419.
- 10
11 Gordeuk, V.R., Minniti, C.P., Nouraie, M., Campbell, A.D., Rana, S.R., Luchtman-Jones, L., Sable,
12 C., Dham, N., Ensing, G., Prchal, J.T., Kato, G.J., Gladwin, M.T. & Castro, O.L. (2011)
13 Elevated tricuspid regurgitation velocity and decline in exercise capacity over 22 months of
14 follow up in children and adolescents with sickle cell anemia. *Haematologica*, **96**, 33–40.
- 15
16 Hackney, A.C., Hezier, W., Gulledge, T.P., Jones, S., Strayhorn, D., Busby, M., Hoffman, E. &
17 Orringer, E.P. (1997) Effects of Hydroxyurea Administration on the Body Weight, Body
18 Composition and Exercise Performance of Patients with Sickle-Cell Anaemia. *Clinical*
19 *Science*, **92**, 481–486.
- 20
21 Halle, M., Korsten-Reck, U., Wolfarth, B. & Berg, A. (2004) Low-grade systemic inflammation in
22 overweight children: impact of physical fitness. *Exercise Immunology Review*, **10**, 66–74.
- 23
24 Hamer, M., Sabia, S., Batty, G.D., Shipley, M.J., Tabàk, A.G., Singh-Manoux, A. & Kivimaki, M.
25 (2012) Physical Activity and Inflammatory Markers Over 10 Years: Follow-Up in Men and
26 Women from the Whitehall II Cohort Study. *Circulation*, CIRCULATIONAHA.112.103879.
- 27
28 Hebbel, R.P. (2011) Reconstructing sickle cell disease: A data-based analysis of the ‘hyperhemolysis
29 paradigm’ for pulmonary hypertension from the perspective of evidence-based medicine.
30 *American Journal of Hematology*, **86**, 123–154.
- 31
32 Hebbel, R.P., Osarogiagbon, R. & Kaul, D. (2004) The Endothelial Biology of Sickle Cell Disease:
33 Inflammation and a Chronic Vasculopathy. *Microcirculation*, **11**, 129–151.
- 34
35 Heimlich, B.J., Speed, J.S., O’Connor, P.M., Pollock, J.S., Townes, T.M., Meiler, S.E., Kutlar, A. &
36 Pollock, D.M. (2016) Endothelin-1 contributes to the progression of renal injury in sickle cell
37 disease via reactive oxygen species. *British Journal of Pharmacology*, **173**, 386–395.
- 38
39 Hoppe, C.C. (2014) Inflammatory Mediators of Endothelial Injury in Sickle Cell Disease.
40 *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **28**, 265–286.
- 41
42 Jais, A., Einwallner, E., Sharif, O., Gossens, K., Lu, T.T.-H., Soyal, S.M., Medgyesi, D., Neureiter, D.,
43 Paier-Pourani, J., Dalgaard, K., Duvigneau, J.C., Lindroos-Christensen, J., Zapf, T.-C.,
44 Amann, S., Saluzzo, S., Jantscher, F., Stiedl, P., Todoric, J., Martins, R., Oberkofler, H., et al
45 (2014) Heme oxygenase-1 drives metaflammation and insulin resistance in mouse and man.
46 *Cell*, **158**, 25–40.
- 47
48 Ji, L.L., Gomez-Cabrera, M.-C. & Vina, J. (2006) Exercise and Hormesis. *Annals of the New York*
49 *Academy of Sciences*, **1067**, 425–435.
- 50
51 Kadoglou, N.P.E., Iliadis, F., Angelopoulou, N., Perrea, D., Ampatzidis, G., Liapis, C.D. & Alevizos,
52 M. (2007) The anti-inflammatory effects of exercise training in patients with type 2 diabetes
53 mellitus. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation: Official Journal*
54 *of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and*
55 *Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology*, **14**, 837–843.
- 56
57 Kato, G.J., Nouraie, S.M. & Gladwin, M.T. (2013) Lactate dehydrogenase and hemolysis in sickle cell
58 disease. *Blood*, **122**, 1091–1092.
- 59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- Kemi, O.J., Loennechen, J.P., Wisløff, U. & Ellingsen, Ø. (2002) Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology*, **93**, 1301–1309.
- Liem, R.I., Onyejekwe, K., Olszewski, M., Nchekwube, C., Zaldivar, F.P., Radom-Aizik, S., Rodeghier, M.J. & Thompson, A.A. (2015a) The acute phase inflammatory response to maximal exercise testing in children and young adults with sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, **171**, 854–861.
- Liem, R.I., Reddy, M., Pelligra, S.A., Savant, A.P., Fernhall, B., Rodeghier, M. & Thompson, A.A. (2015b) Reduced fitness and abnormal cardiopulmonary responses to maximal exercise testing in children and young adults with sickle cell anemia. *Physiological Reports*, **3**, Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4425953/> [Accessed June 24, 2016].
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, **25**, 402–408.
- Manci, E.A., Hyacinth, H.I., Capers, P.L., Archer, D.R., Pitts, S., Ghosh, S., Patrickson, J., Titford, M.E., Ofori-Acquah, S.F. & Hibbert, J.M. (2014) High protein diet attenuates histopathologic organ damage and vascular leakage in transgenic murine model of sickle cell anemia. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, **239**, 966–974.
- Martin, C., Pialoux, V., Faes, C., Charrin, E., Skinner, S. & Connes, P. (2015) Does physical activity increase or decrease the risk of sickle cell disease complications? *British Journal of Sports Medicine*, bjsports-2015-095317.
- McConnell, D.M.E., Daniels, S.R., Lobel, J., James, F.W. & Kaplan, S. (1989) Hemodynamic response to exercise in patients with sickle cell anemia. *Pediatric Cardiology*, **10**, 141–144.
- Nath, K.A. & Hebbel, R.P. (2015) Sickle cell disease: renal manifestations and mechanisms. *Nature Reviews Nephrology*, **11**, 161–171.
- Oberley, L.W. & Spitz, D.R. (1984) Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods in enzymology*, **105**, 457–464.
- Paglia, D.E. & Valentine, W.N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, **70**, 158–169.
- Pathare, A., Kindi, S.A., Daar, S. & Dennison, D. (2003) Cytokines in sickle cell disease. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, **8**, 329–337.
- Pedersen, B.K. & Hoffman-Goetz, L. (2000) Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiological Reviews*, **80**, 1055–1081.
- Pereira, M.G., Ferreira, J.C.B., Jr, C.R.B., Mattos, K.C., Rosa, K.T., Irigoyen, M.C., Oliveira, E.M., Krieger, J.E. & Brum, P.C. (2009) Exercise training reduces cardiac angiotensin II levels and prevents cardiac dysfunction in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. *European Journal of Applied Physiology*, **105**, 843–850.
- Platt, O.S., Brambilla, D.J., Rosse, W.F., Milner, P.F., Castro, O., Steinberg, M.H. & Klug, P.P. (1994) Mortality In Sickle Cell Disease – Life Expectancy and Risk Factors for Early Death. *New England Journal of Medicine*, **330**, 1639–1644.

- 1
2
3 van Putten, M., de Winter, C., van Roon-Mom, W., van Ommen, G.-J., 't Hoen, P.A.C. & Aartsma-
4 Rus, A. (2010) A 3 months mild functional test regime does not affect disease parameters in
5 young mdx mice. *Neuromuscular Disorders*, **20**, 273–280.
6
7 Ravelojaona, M., Féasson, L., Oyono-Enguéllé, S., Vincent, L., Djoubairou, B., Ewa'Sama Essoue, C.
8 & Messonnier, L.A. (2015) Evidence for a Profound Remodeling of Skeletal Muscle and Its
9 Microvasculature in Sickle Cell Anemia. *The American Journal of Pathology*, **185**, 1448–
10 1456.
11
12 Shaskey, D.J. & Green, G.A. (2000) Sports haematology. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, **29**, 27–
13 38.
14
15 Sparkenbaugh, E. & Pawlinski, R. (2013) Interplay between coagulation and vascular inflammation in
16 sickle cell disease. *British journal of haematology*, **162**,
17
18 Stuart, M.J. & Nagel, R.L. (2004) Sickle-cell disease. *The Lancet*, **364**, 1343–1360.
19
20 Sullivan, M.J., Higginbotham, M.B. & Cobb, F.R. (1988) Exercise training in patients with severe left
21 ventricular dysfunction. Hemodynamic and metabolic effects. *Circulation*, **78**, 506–515.
22
23 Szczepanek, S.M., McNamara, J.T., Secor, E.R., Natarajan, P., Guernsey, L.A., Miller, L.A.,
24 Ballesteros, E., Jellison, E., Thrall, R.S. & Andemariam, B. (2012) Splenic morphological
25 changes are accompanied by altered baseline immunity in a mouse model of sickle-cell
26 disease. *The American Journal of Pathology*, **181**, 1725–1734.
27
28 Tharoux, P.-L. (2011) Endothelin in renal injury due to sickle cell disease. *Contributions to*
29 *Nephrology*, **172**, 185–199.
30
31 Topley, J.M., Rogers, D.W., Stevens, M.C. & Serjeant, G.R. (1981) Acute splenic sequestration and
32 hypersplenism in the first five years in homozygous sickle cell disease. *Archives of Disease in*
33 *Childhood*, **56**, 765–769.
34
35 Toumi, H. & Best, T. (2003) The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *British*
36 *Journal of Sports Medicine*, **37**, 284–286.
37
38 Waltz, X., Hedreville, M., Sinnapah, S., Lamarre, Y., Soter, V., Lemonne, N., Etienne-Julan, M.,
39 Beltan, E., Chalabi, T., Chout, R., Hue, O., Mougenel, D., Hardy-Dessources, M.-D. &
40 Connes, P. (2012) Delayed beneficial effect of acute exercise on red blood cell aggregate
41 strength in patients with sickle cell anemia. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **52**,
42 15–26.
43
44 Waltz, X., Romana, M., Lalanne-Mistrih, M.-L., Machado, R.F., Lamarre, Y., Tarer, V., Hardy-
45 Dessources, M.-D., Tressières, B., Divialle-Doumdo, L., Petras, M., Maillard, F., Etienne-
46 Julan, M. & Connes, P. (2013) Hematologic and hemorheological determinants of resting and
47 exercise-induced hemoglobin oxygen desaturation in children with sickle cell disease.
48 *Haematologica*, **98**, 1039–1044.
49
50 Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff,
51 J., Jungers, P. & Descamps-Latscha, B. (1996) Advanced oxidation protein products as a
52 novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, **49**, 1304–1313.
53
54 Wood, K.C. & Granger, D.N. (2007) Sickle Cell Disease: Role of Reactive Oxygen and Nitrogen
55 Metabolites. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **34**, 926–932.
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Yang, A.-L. & Chen, H.-I. (2003) Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. *Atherosclerosis*, **169**, 11–17.

Zoppini, G., Targher, G., Zamboni, C., Venturi, C., Cacciatori, V., Moghetti, P. & Muggeo, M. (2006) Effects of moderate-intensity exercise training on plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in older patients with type 2 diabetes. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **16**, 543–549.

For Peer Review

Figure Legend

Table 1. *Haematological physical and exercise characteristics of trained and untrained SS mice, before and after exercise training program.* RBC, red blood cell count; tHb, total haemoglobin; LDH, lactate dehydrogenase; $\dot{V}O_2$ peak, peak oxygen consumption, MAS, Maximal aerobic speed. UT-SS (n=7) and T-SS (n=10). Values are presented as means \pm SEM. § ($p<0.05$) vs. UT-Pre; # ($p<0.05$) vs. UT-Post; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Table 2. *Oxidative stress and antioxidant responses in trained and untrained SS mice.* Cardiac and hepatic oxidative stress marker, AOPP (Advanced oxidation protein products), antioxidant activity of GPx (Glutathione peroxidase), Catalase and SOD (superoxide dismutase) and antioxidant mRNA levels of HO-1 (haem oxygenase-1) and NQO-1 (NADPH quinone oxidoreductase) were measured. Values are presented as means \pm SEM. UT-SS (n=7) and T-SS (n=10). * $p<0.05$.

Figure 1. *Exercise training induced a physiological decrease in haematocrit and improved CO-oximetry parameters in SS mice.* Haematocrit (A), venous oxyhaemoglobin (B) and venous carboxyhaemoglobin (C) were assessed in UT-SS (n=7) and T-SS (n=10). Values are expressed as means \pm SEM. * $p<0.05$, *** $p<0.001$.

Figure 2. *Systemic inflammation was attenuated by exercise training in SS mice.* WBC (White blood cell) count (A) was determined in UT-SS (n=7) and T-SS (n=10). Plasma Th1/Th2 ratios (B) were calculated in UT-SS (n=5) and T-SS (n=6). IL-2, interleukin-2; IL-4, interleukin-4; IL-5, interleukin-5; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; TNF- α , tumour necrosis factor- α . Values are presented as means \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, ^a $p=0.06$.

Figure 3. *Moderate exercise training decreased pro-inflammatory cytokines but did not affect adhesion molecules expression in the kidney of SS mice.* Pro-inflammatory cytokines (A) and adhesion molecules (B) mRNA expression was assessed in UT-SS (n=5) and T-SS (n=8). VCAM-1, vascular adhesion molecule-1; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; TNF- α , tumour necrosis factor- α ; IL-1 β , interleukin-1 β ; IL-6, interleukin-6, ET-1, endothelin-1. Values are expressed as means \pm SEM. * $p<0.05$.

Figure 4. *Spleen congestion was reduced in trained SS mice.* (A) Spleen congestion score was quantified in UT-SS (n=5) and T-SS (n=8). (B) Correlation between relative spleen weight and spleen congestion score was established in all animals (n=13). (C) shows representative H&E stained spleen tissue sections of UT-SS and T-SS. Adhesion molecules and pro-inflammatory cytokines mRNA expression (D) was quantified in the spleen of UT-SS (n=7) and T-SS (n=10). Vcam-1, vascular adhesion molecule-1; Icam-1, intercellular adhesion molecule-1; Tnf- α , tumour necrosis factor- α . Values are expressed as means \pm SEM.

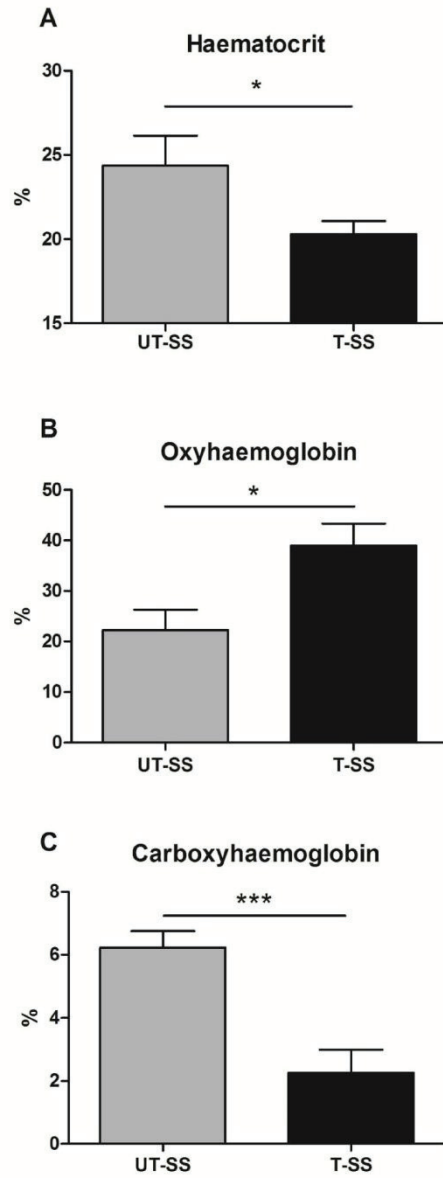
Table 1.

	UT-Pre	T-Pre	UT- Post	T- Post	Time effect	Training effect
Haematology						
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	6.6 ± 0.4	5.8 ± 0.3	5.7 ± 0.5	4.8 ± 0.2	*	*
tHb (g/dL)	7.5 ± 0.5	6.9 ± 0.3	6.3 ± 0.4	5.6 ± 0.2	**	*
Reticulocytes (%)	53.1 ± 1.9	55.8 ± 1.9	57.0 ± 4.4	58.0 ± 2.6	NS	NS
Lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	23.9 ± 1.8	19.1 ± 2.3	17.3 ± 2.3	12.0 ± 0.8 #	***	*
Monocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	4.1 ± 0.3	2.8 ± 0.4 \$	1.6 ± 0.3	1.2 ± 0.1	***	*
Granulocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	6.2 ± 0.9	4.4 ± 0.9	2.8 ± 0.8	1.5 ± 0.2	***	NS
Platelets ($10^3/\mu\text{L}$)	558.3 ± 64.5	451.1 ± 65.5	548.7 ± 67.3	452.9 ± 79.9	NS	NS
TPH (μM)	-	-	45.1 ± 3.6	40.3 ± 1.6	-	-
Tot plasma Hb (mg/dL)	-	-	80.1 ± 6.5	71.8 ± 2.9	-	-
LDH (IU/L)	-	-	281.2 ± 9.8	267.1 ± 7.1	-	-
Physical						
Body weight (g)	25.7 ± 0.9	25.8 ± 0.5	28.2 ± 0.4	28.2 ± 0.5	***	NS
Heart weight (mg)	-	-	185.7 ± 9.7	202.2 ± 6.0	-	-
Heart w/body w (mg/g)	-	-	6.6 ± 0.3	7.2 ± 0.2	-	-
Spleen weight (mg)	-	-	1976.5 ± 264.4	1607.8 ± 92.8 #	-	-
Spleen w/body w (mg/g)	-	-	74.3 ± 9.7	57.2 ± 3.3 #	-	-
Exercise						
$\dot{V}\text{O}_2\text{peak}$ (ml/min/kg)	6881.6 ± 194.3	7160.5 ± 145.0	-	-	-	-
MAS (m/min)	13.9 ± 1.0	13.4 ± 0.6	-	-	-	-

Table 2.

	UT-SS	T-SS
Heart		
AOPP (nmol/mg prot)	26.6 ± 1.7	21.9 ± 0.8*
Catalase (nmol/mg prot)	19.3 ± 12.0	9.8 ± 3.7
GPx (nmol/min/mg prot)	10.3 ± 1.9	10.0 ± 1.9
SOD (nmol/min/mg prot)	1.6 ± 0.2	1.4 ± 0.1
Hmox-1 mRNA (relative to UT-SS)	1.0	0.9 ± 0.1
Nqo-1 mRNA (relative to UT-SS)	1.0	1.5 ± 0.1
Liver		
AOPP (nmol/mg prot)	38.7 ± 3.0	37.7 ± 2.7
Catalase (nmol/mg prot)	4.8 ± 0.7	5.1 ± 0.7
GPx (nmol/min/mg prot)	4.9 ± 0.7	5.0 ± 0.5
SOD (nmol/min/mg prot)	3.0 ± 0.5	2.9 ± 0.4
Hmox-1 mRNA (relative to UT-SS)	1.0	0.8 ± 0.1*
Nqo-1 mRNA (relative to UT-SS)	1.0	0.9 ± 0.1

Figure 1.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 2.

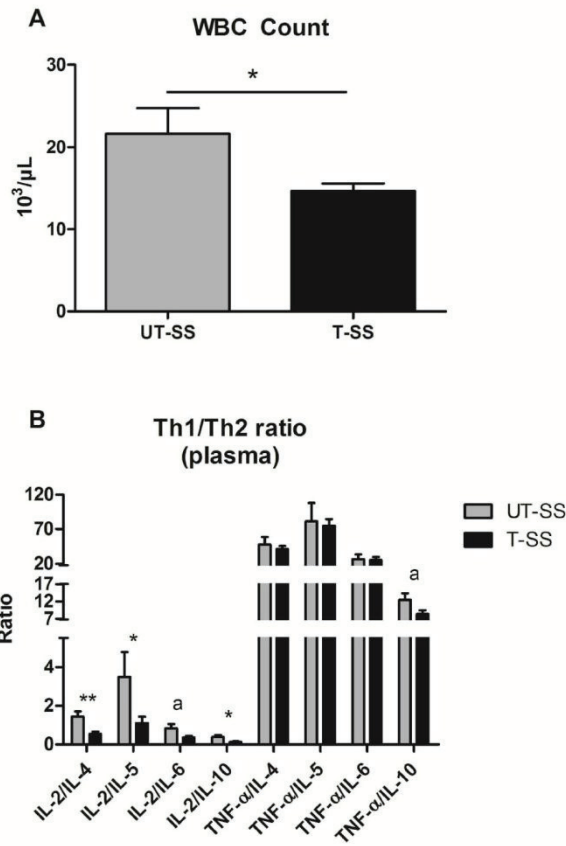
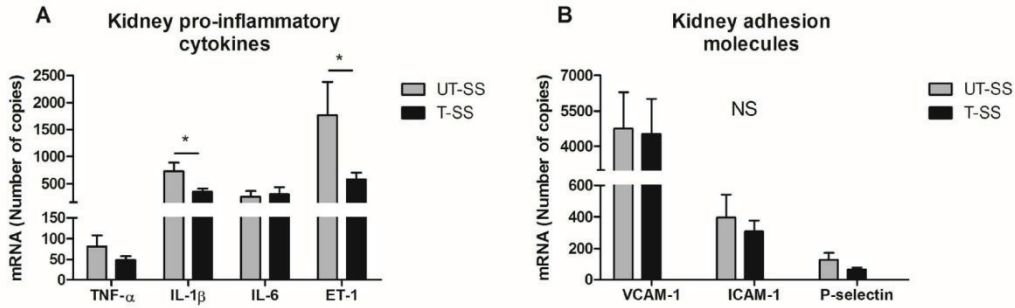


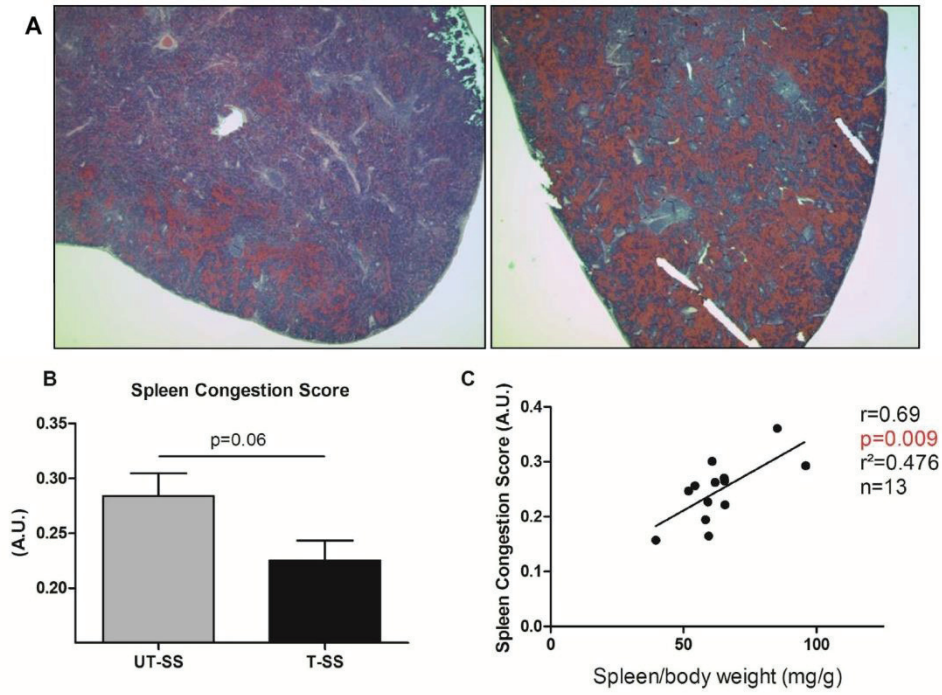
Figure 3.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Figure 4.



Supplementary Table 1. *Haematological physical and exercise characteristics of untrained AA mice, before (AA-Pre) and after (AA-Post) exercise training program.* RBC, red blood cell count; tHb, total haemoglobin; LDH, lactate dehydrogenase; $\dot{V}O_2$ peak, peak oxygen consumption, MAS, Maximal aerobic speed. AA-Pre (n=6) and AA-Post (n=6). Values are presented as means \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs. AA-Post (Paired t-test).

	AA-Pre	AA-Post
Haematology		
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	9.8 \pm 0.3	8.2 \pm 0.4**
tHb (g/dL)	12.2 \pm 0.4	11.4 \pm 0.5
Lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	10.5 \pm 0.5	9.6 \pm 0.6
Monocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	0.9 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
Granulocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	1.1 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1
Platelets ($10^3/\mu\text{L}$)	1273.0 \pm 151.1	1086.0 \pm 153.9**
Physical		
Body weight (g)	26.6 \pm 0.4	30.1 \pm 0.7**
Heart weight (mg)	-	179.6 \pm 8.2
Heart w/body w (mg/g)	-	5.9 \pm 0.2
Spleen weight (mg)	-	201.4 \pm 29.4
Spleen w/body w (mg/g)	-	6.6 \pm 1.0
Exercise		
$\dot{V}O_2$ peak (ml/min/kg)	8392.0 \pm 294.2	-
MAS (m/min)	31.8 \pm 1.0	-

Malgré une aptitude physique aérobie limitée par rapport aux souris saines AA, les souris SS ont bien toléré les sessions d'entraînement. Cette assumption est appuyée, par l'absence de mortalité liée à l'exercice dans le groupe des SS entraînées, ainsi que par une réponse physiologique de diminution de l'hématocrite associée à une absence de variations du nombre de GRs et de la concentration en Hb avec l'entraînement. Parmi les résultats les plus intéressants, la proportion d'oxyhémoglobine était augmentée dans le compartiment veineux chez les souris SS entraînées par rapport aux sédentaires. Ceci suggère une moindre désoxygénation veineuse de l'HbS qui pourrait alors limiter le risque de formation de polymères et donc, par extrapolation, réduire la falciformation. En parallèle, l'entraînement a diminué la proportion veineuse en carboxyhémoglobine, marqueur indirect d'hémolyse. L'analyse des autres marqueurs classiques d'hémolyse (*i.e.* LDH, hème et hémoglobine plasmatique) montre une légère baisse de ces paramètres qui n'est toutefois pas significative. Pourtant, une légère réduction des processus hémolytiques pourrait limiter le stress oxydant comme le suggère la réduction de la concentration cardiaque en produits d'oxydation des protéines (AOPP) chez nos souris entraînées. Cependant, des analyses complémentaires devraient être menées pour confirmer le rôle de l'entraînement sur l'hémolyse chez les SS. L'entraînement semble également atténuer l'inflammation systémique comme en témoigne la diminution significative du nombre de leucocytes et du ratio Th1/Th2, indiquant une stimulation des mécanismes anti-inflammatoires chez les souris SS. Ainsi la moindre inflammation systémique pourrait se refléter au niveau organique comme le suggère l'expression rénale réduite des ARNm d'IL-1 β et de l'endothéline-1 étaient chez les souris SS entraînées par rapport à leurs congénères sédentaires. De façon spéculative, si le risque de falciformation est effectivement réduit et que l'hémolyse est amoindrie, la formation de micro-thrombi dans la médulla rénale et l'hyperfiltration glomérulaire (mécanismes détaillés en I.B.5.d) pourraient être elles aussi limitées, améliorant *in fine* la fonction rénale. Cette hypothèse reste bien évidemment à vérifier grâce à des mesures histologiques et du débit de filtration glomérulaire. Enfin, l'entraînement

aurait pour conséquence de limiter la congestion splénique ainsi que l'amplitude de la splénomégalie, caractéristiques des souris SS. Cependant, le potentiel effet bénéfique de l'entraînement sur la fonction splénique reste à confirmer puisque dans cette étude aucune variation de l'expression ARNm de molécules d'adhérence et de cytokines pro-inflammatoires n'a été observée entre les souris entraînées et sédentaires

Au final, l'entraînement apparaît comme un modulateur intéressant de l'oxygénation veineuse, de l'inflammation systémique et rénale et de la congestion splénique et comme un modulateur potentiel de l'hémolyse et du stress oxydant chez des souris SS Townes. Ce travail complète et renforce les données précédentes concernant les effets positifs multiples de l'entraînement dans la drépanocytose. On pourrait alors à présent envisager, sous haut contrôle médical toutefois, d'expérimenter chez l'Homme. En effet, l'entraînement physique à intensité modérée n'induit pas d'effets secondaires indésirables notables chez les souris SS entraînées et engendre même des effets bénéfiques sur une pléthore de variables physiopathologiques dans les organes majoritairement affectés par la maladie.

Etude 4 : Effets du blocage des RAGEs sur l'inflammation, le stress oxydant et le métabolisme de l'oxyde nitrique chez des souris transgéniques drépanocytaires Townes

Charrin E., Faes C., Pialoux V., Connes P., Joly P., Martin C.

En préparation

Dans les études 1 et 2, nous avons observé respectivement, une augmentation du MDA cardiaque chez des SAD soumises à un stress d'H/R comparées aux souris saines et une élévation des concentrations en AOPP dans le foie, la rate et le rein de souris Townes SS à l'état stable comparées aux AA. Or, le stress oxydant est un facteur essentiel de la physiopathologie drépanocytaire qui amplifie la vasculopathie et promeut le développement de dommages organiques multifocaux (Aslan and Freeman, 2007; Nur et al., 2011a; Wood et al., 2008). Le fort taux d'hémolyse conduit à une libération accrue du contenu érythrocytaire dont l'hème qui induit des dommages oxydants au niveau endothélial en libérant son fer. Les phénomènes d'ischémie-reperfusion se produisant lors d'occlusions vasculaires exacerbent également le stress oxydant via une surproduction d'anions superoxyde notamment par la xanthine oxydase.

Récemment, des concentrations élevées en produits avancés de la glycation (AGEs) ont été mesurées chez des patients drépanocytaires (Nur et al., 2010; Somjee et al., 2005). Ces composés générés de façon non-enzymatique par glycation de protéines et lipides via la réaction de Maillard sont des acteurs connus du stress oxydant après fixation sur leur récepteur (RAGE) (Singh et al., 2001). L'interaction AGE-RAGE a de multiples conséquences délétères telles qu'une surproduction de cytokines pro-inflammatoires, de molécules d'adhérence vasculaire, d'agents pro-oxydants ainsi qu'une inactivation du NO. Au niveau organique, l'accumulation des AGEs se traduit par une glomérulopathie, une hépatopathie, des dysfonctions cardiovasculaires et une hypertension pulmonaire dans le diabète et d'autres maladies inflammatoires chroniques. Autant de manifestations cliniques qui sont également caractéristiques de la drépanocytose. Pourtant, le rôle possible des RAGEs dans la pathogenèse de la maladie n'a fait l'objet d'aucune étude à ce jour. Ainsi, afin de tester l'hypothèse d'une contribution des RAGEs à la promotion du statut pro-oxydant et pro-inflammatoire dans la drépanocytose, nous avons procédé à une inhibition pharmacologique de ces derniers chez des souris drépanocytaires Townes.

Le traitement consistait alors en une injection intrapéritonéale quotidienne, 5 jours par semaine pendant 3 semaines, d'un antagoniste spécifique du récepteur (RAP : RAGE Antagonist Peptide) chez des souris Townes. Les analyses réalisées à l'issue du traitement reposaient sur des mesures des paramètres hématologiques ; d'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α ; de la molécule d'adhérence vasculaire VCAM-1 ; de marqueurs du stress oxydant (NADPH Oxydase, AOPP), d'activité d'enzymes antioxydantes (GPx, SOD) et du métabolisme du NO (eNOS, Nitrite/Nitrate) et ce, dans les principaux organes affectés par la maladie, le cœur, le foie, le rein, le poumon.

Effects of RAGE blockade on inflammation, oxidative stress and nitric oxide metabolism in transgenic Townes sickle mice

Emmanuelle CHARRIN^{1,2}, Camille FAES^{1,2}, Vincent PIALOUX^{1,2,3}, Philippe CONNES^{1,2,3}
Philippe Joly^{1,2,4}, and Cyril MARTIN^{1,2}

¹Interuniversity Laboratory of Human Movement Biology, University Claude Bernard Lyon 1, University of Lyon, Villeurbanne, France

²Laboratory of Excellence “GR-Ex”, Paris, France

³Institut Universitaire de France, Paris, France

⁴Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Hospital Edouard Herriot, CHU de Lyon, Lyon, France

Introduction

Sickle cell disease (SCD) is one of the most common severe monogenic disorders worldwide. Mutated intraerythrocytic hemoglobin S results from a substitution of valine for glutamic acid on the beta globin gene and leads to the formation of sickle-shaped red blood cells (RBCs) (Ballas & Mohandas, 1996). The homozygous disease is characterized by increased RBCs fragility, decreased RBCs deformability and increased endothelial adhesion that respectively promote chronic hemolytic anemia and painful vaso-occlusive crises (VOC) (Rees *et al.*, 2010). In sickle cell patients, oxidative stress and inflammation are increased and exacerbate SCD vasculopathy and development of multiple organ damages (Wood *et al.*, 2008; Sparkenbaugh & Pawlinski, 2013). Following hemolysis, hydrophobic free heme inserts into endothelial cell (EC) membranes and releases highly reactive iron (Balla *et al.*, 1991). Chronic exposition of ECs to hemoglobin and heme thus promote activated proinflammatory phenotype (Wagener *et al.*, 2001). Ischemia-reperfusion injury occurring during VOC is thought to be caused by the entrapment of young adherent erythrocytes and leucocytes in the microcirculation (Kaul & Hebbel, 2000). Intermittent I/R events further worsen vascular dysfunction and oxidative stress by overproducing reactive oxygen species (ROS) which scavenge the potent vasodilatory agent, nitric oxide (NO) (Wood *et al.*, 2008).

Under oxidative conditions, advanced glycation end products (AGEs) are generated by non-enzymatic glycation and oxidation of proteins and lipids in the Maillard reaction (Singh *et al.*, 2001). Beyond their valuable role as well-established markers of oxidative stress (Genuth *et al.*, 2005; Koyama *et al.*, 2007; Meerwaldt *et al.*, 2008), AGEs when binding to their receptor (RAGE), have been demonstrated to contribute to the pathophysiology of organ complications in diabetes mellitus and other chronic inflammatory diseases (Miyata *et al.*, 1998; Huebschmann *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2012). The accumulation of AGEs has been shown to participate in renal filtration alteration and glomerulopathy (Ahmed, 2005; Tan *et al.*, 2007), hepatic fibrosis and cirrhosis (Hyogo & Yamagishi, 2008; Santos *et al.*, 2013), cardiovascular dysfunctions (Hartog *et al.*, 2007; Hegab *et al.*, 2012) and pulmonary hypertension (Meloche *et al.*, 2013). The underlying molecular mechanisms involve enhanced production of pro-inflammatory cytokines, adhesion molecules and oxidants and suppressed nitric oxide synthesis following RAGE activation (Rojas *et al.*, 2000; Ahmed, 2005; Goldin *et al.*, 2006).

Although numerous SCD-related organs complications are consistent with tissue damage induced by RAGE activation, the possible role for the receptor in the pathogenesis of SCD has been poorly investigated. Only two previous studies reported increased plasma AGEs concentrations in children and adults with homozygous SCD at steady state with no further increase during VOC (Somjee *et al.*, 2005; Nur *et al.*, 2010). To test the hypothesis that RAGE may contribute to the pro-oxidant and the proinflammatory state of SCD, we compared cytokines expression and oxidative stress markers levels, in a humanized transgenic mouse model of SCD (Townes) expressing exclusively human sickle hemoglobin, subjected to pharmacological inhibition of RAGE with a specific antagonist peptide (RAP: RAGE antagonist peptide).

Material & methods

Animals

We have established a colony of Townes sickle mice in our laboratory originally purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Mouse genotypes were confirmed by

PCR. Townes mice have both human α - and β -globin genes knocked into the mouse locus, allowing the generation of littermates AA (healthy controls) and SS (homozygous SCD) mice. A total of 26 mice aged 8-9 weeks old were used and maintained on a 12-hour light-dark cycle with food and water *ad libitum*. The guidelines from the French Ministry of Agriculture for experimental procedures and the Institute for Laboratory Animal Research (National Academy of Sciences, USA) were followed and the protocol was approved by the regional animal care committee (Rhône-Alpes, France).

RAGE Antagonist Peptide treatment

RAGE antagonist peptide (RAP; 5mg/kg, #553031, Merck Millipore, Molsheim, France) was administered by I.P. injection, five days per week for 3 weeks, as previously proposed (Arumugam *et al.*, 2012). Saline solution (NaCl 0.9%) was used as control.

Tissue sampling

The day after the last injection, mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (50mg/Kg, Dolethal®, Vétoquinol, Lure, France) and blood was collected by a retro-orbital venipuncture into EDTA tubes for hematological analysis. Mice were sacrificed by exsanguination with a 0.9% NaCl transcardial perfusion for 70 seconds. Heart, lungs, liver and kidneys were collected and immediately frozen in liquid nitrogen for oxidative stress and qRT-PCR analyses.

Hematology

An ABX Micros 60 automat (Horiba, Montpellier, France) was used for the following hematological measurements: hematocrit (Hct), red blood cell (RBC) count, hemoglobin concentration, mean corpuscular volume (MCV), RBC distribution width (RDW), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular hemoglobin (MCH), white

blood cell (WBC) count, lymphocyte, monocyte and granulocyte count, platelet count, mean platelet volume (MPV). The percentage of reticulocytes and sickle cells were assessed on smears stained with brilliant cresyl blue (860867, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) by two investigators under a light microscope (BX43 Microscope, Olympus, Tokyo, Japan).

qRT-PCR for cytokines mRNA expression

Total mRNA from organs was isolated using Trizol reagent (Tri Reagent LS, Euromedex, Souffelweyersheim, France) according to the manufacturer instructions, purified with DNase I (EN0525, ThermoFisher scientific, Waltham, MA, USA) and concentrated at 80 ng/ μ L. One thousand ng per sample of total mRNA were reverse transcribed to cDNA with the reverse transcriptase RNase Hminus (Promega, Madison, WI, USA) using oligo (T)15 (Eurogentec, Seraing, Belgium). RT calibration was done in the presence of 80 pg of a synthetic external and non-homologous 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 Rotor-Gene Q system (Qiagen, Venlo, Netherlands) by using the Rotor-Gene SYBR® green PCR kit (Qiagen, Venlo, Netherlands). The thermal profiles consisted of 15 min 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); *Interleukine-1 β* (IL-1 β ; 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); *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α ; M13049.1) forward 5' CTG TAG CCC ACG TCG TAG C 3', reverse 5' TTG AGA TCC ATG CCG TTG 3' (97 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).

Oxidative stress and antioxidant assessment

Heart, liver and kidney were homogenized (10%, w/v) in PBS 1X + EDTA 0.5mM in ice. After centrifugation at 12,000g for 10 min at 4°C, the supernatant was collected for oxidative stress markers measurements. Homogenate aliquots were stored at -80°C. Protein concentrations 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) and spectrophotometric measurements were performed on TECAN Infinite 2000 plate reader (Männedorf, Switzerland). Results were standardized per mg of total protein.

Advanced oxidation protein products (AOPP) were determined using the method developed by Witko-Sarsat et al. (Witko-Sarsat *et al.*, 1996) as previously described (Pialoux *et al.*, 2009). AOPP were calibrated with a chloramine-T solution that absorbs at 340nm in the presence of potassium iodide. The absorbance of the reaction was immediately read at 340nm on the microplate reader against a blank containing 200µL of PBS. AOPP activity was expressed as micromoles per liter of chloramine-T equivalents.

Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined by the modified method of Paglia and Valentine (Paglia & Valentine, 1967). GPx activity represents the rate of NADPH elimination in NADP⁺ after addition of glutathione reductase, reduced glutathione and NADPH using hydrogen peroxide (H₂O₂) as substrate.

Superoxide dismutase (SOD) activity was determined using the Oberley and Spitz method (Oberley & Spitz, 1984) and represents the degree of inhibition of the reaction

between superoxide radicals, produced by a hypoxanthine - xanthine oxidase system, and nitroblue tetrazolium.

NADPH oxidase activity represents the degree of inhibition of the reaction between superoxide radicals, produced by NADPH oxidase, and nitroblue tetrazolium.

Statistics

Statistical analyses were performed using Statistica Software (Tulsa, OK, USA). All variables were tested for normality and variance homogeneity. Oxidative stress and RT-qPCR analyses were compared using two-way ANOVA followed by planned comparisons and a bilateral Student t-test was performed on sickle cells count data. A “*p*-value” inferior to 0.05 was considered statistically significant. The data were expressed as means ± SD.

Results

Effects of RAGE blockade on hematological parameters

Hematological changes are detailed in Table 1 and Figure 1. MCV, RDW, MCH, WBCs and reticulocyte count were significantly higher in the SS group while MCHC, platelet count, MPV, hematocrit, RBCs and hemoglobin level were lower in SS mice than in their AA littermates (Table 1 & Figure 1). Although there was no treatment effect on white blood cell and platelets indices (Table 1), hematocrit and RBC count significantly increased and reticulocyte count significantly decreased in RAP-treated SS compared to vehicle-SS mice (Figure 1).

Proinflammatory and adhesion molecules mRNA expression after RAGE inhibition

After the 3 weeks of treatment, sickle mice presented similar variations in several genes encoding for pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α) and adhesion molecule (VCAM-1) in heart, lung, liver and kidney (Figure 2). While IL-1 β mRNA expression was higher in the

lung, liver and kidney of vehicle-SS compared to their AA counterparts (Figure 2A), RAP-SS mice displayed decreased IL-1 β mRNA in the lung ($p < 0.05$) compared to Veh-SS. In the liver, IL-1 β mRNA in RAP-SS was not different from those in AA mice, and tended to be lower than in Veh-SS ($p = 0.08$). Similarly, TNF- α mRNA expression was more than 10 times higher in vehicle-SS liver and 5 times greater in the kidney (Figure 2B) than in Veh-AA mice. In contrast, TNF- α mRNA was significantly reduced in RAP-SS kidney ($p < 0.05$) and tended to be lower in the heart ($p = 0.08$) compared to vehicle-SS (Figure 2B). A genotype effect was observed with a higher number of mRNA copies encoding for VCAM-1 in SS compared to AA (Figure 2C). While VCAM-1 mRNA was more abundant in the heart of vehicle-SS than in AA mice, its expression was limited in SS treated with RAP (Figure 2C).

Effect of RAGE inhibition on oxidative stress markers and antioxidant enzymes activity

NADPH oxidase activity was not different among the four groups in the heart (Figure 3A). In the liver, NADPH oxidase was significantly more active in vehicle-SS than in vehicle-AA mice while the same difference was not noticeable in RAP-treated mice. An overall treatment effect was found in the activity of this enzyme with decreased NADPH activities in RAP-treated mice (AA and SS) compared to vehicle-treated mice in the kidney (Figure 3A). AOPP levels were significantly higher in SS liver than in AA whereas no difference was observed in the heart and kidney (Figure 3B). No changes were observed in antioxidant enzymes activity in the heart (Figure 3C-3D). GPx activity was reduced in vehicle-SS liver compared to AA and in the kidney of RAP-SS compared to vehicle-SS mice (Figure 3C). Finally, SOD activity was greater in RAP-SS liver than in vehicle-SS mice (Figure 3D).

Changes in NO metabolism after RAGE blockade

Vehicle-SS expressed more eNOS mRNA than vehicle-AA in the heart and kidney (Figure 4A). Additionally, the number of copies was higher in RAP-SS compared to RAP-AA mice in

the kidney whereas the difference was inverted in the heart. In the liver, there was an increase in eNOS mRNA expression in all the SS compared to AA mice. No significant inter-group changes occurred in the lung. Plasma NO end products NOx were increased in SS mice whatever the treatment they received (i.e. Vehicle or RAP; Figure 4B). Ultimately, plasma NOx in RAP-SS significantly increased compared with RAP-AA whereas the same difference was not observed in vehicle-treated mice.

Discussion

As RAGE is a potent and oxidatively active receptor, the current study aimed to investigate the effect of its inhibition on markers of oxidative stress and inflammation in homozygous sickle mice. In support of our hypothesis, the results of the present study demonstrated for the first time that RAGE blockade 1) increased hematocrit and RBC count and decreased reticulocyte count 2) blunted the increase in pro-inflammatory cytokines and adhesion molecule mRNA expression and oxidative stress markers in several organs of SS mice. In addition, RAP treatment increased cardiac and renal eNOS mRNA expression and plasma NOx of SS mice.

The increase in hematocrit, RBC count, the upward trend in hemoglobin level and the decrease in reticulocyte count in RAP-treated sickle mice could suggest that RAGE inhibition may blunt hemolytic process. This finding is in agreement with a previous study reporting a role of AGEs in the pathophysiology of chronic hemolysis-associated organ complications in SCD (Nur *et al.*, 2010). In this study, the authors grouped patients according to Kato *et al.* classification: patients with hemolysis-related clinical complications (pulmonary hypertension, leg ulcers, microalbuminuria, cystolithiasis, ischemic stroke, priapism) or patients with viscosity-vaso-occlusion related (acute painful crisis, acute chest syndrome, retinopathy, osteonecrosis) subphenotype (Kato *et al.*, 2007). They found higher plasma AGE

concentrations in patients with severe hemolysis-related organ complications compared to patients without these complications as well as a strong relationship between hemolysis markers (hematocrit, hemoglobin, reticulocytes and LDH) and plasma AGEs (Nur *et al.*, 2010).

As inflammation plays a key role in the pathophysiology of SCD (Hoppe, 2014) and is potentiated by RAGE activation (Goldin *et al.*, 2006), we assessed the expression of several inflammatory molecules at the mRNA level (Figure 2). In our vehicle-SS Townes mice, the similar high expression of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β and adhesion molecule VCAM-1 in the heart, liver and kidney strengthen the assumption of a systemic pro-inflammatory state in SCD (Akohoue *et al.*, 2007; Hebbel *et al.*, 2009; Krishnan *et al.*, 2010). In SS mice, RAGE inhibition normalized those inflammatory markers levels in some organs (i.e. IL-1 β in the lung and liver; TNF- α in the heart, liver and kidney; VCAM-1 in the heart and liver) to the healthy mice levels. In line with this observation, recent studies showed decreased cardiac TNF- α mRNA expression in a mouse model of inflammatory heart disease knocked-out for RAGE (Bangert *et al.*, 2016) and lower hepatic TNF- α mRNA in RAGE-/- mice after ischemia/reperfusion injury (Zeng *et al.*, 2009). A similar drop in aortic TNF- α and VCAM-1 mRNA occurred in sinoaortic denervated rats treated with soluble RAGEs (sRAGE), acting as a decoy for RAGE (Wu *et al.*, 2013). These authors also detected a downward effect of RAGE inhibition on IL-1 β protein levels in aortic rat tissue when others described no changes in bronchoalveolar lavage fluid of acute lung injury mouse model after RAGE blockade (Zhang *et al.*, 2008; Christaki *et al.*, 2011). In this context, our data suggest that RAGE inhibition could weaken proinflammatory and endothelial adhesion mediators in sickle mice.

Considerable evidences demonstrate increased oxidative stress in sickle cell disease (Chirico & Pialoux, 2012). The primary mechanism by which RAGE generates oxidative

stress is via the activation of NADPH oxidase (Gao *et al.*, 2008). In the liver, our vehicle-SS had more active NADPH oxidase than vehicle-AA mice, as well as more AOPP levels and a decreased GPx activity (Figure 3) suggesting increased production of damaging ROS and an altered capacity to respond to that oxidative stress. These results are consistent with previous studies showing increased hepatic lipid peroxidation and blunted GPx activity in NY1DD (mild SS phenotype) and BERK mice (severe SS phenotype) (Dasgupta *et al.*, 2006). RAP treatment in SS mice lowered hepatic NADPH oxidase activity to AA levels and although liver AOPP was increased, GPx activity was unaltered and SOD activity was higher suggesting a better ability to fight against oxidant attacks. Similarly, sRAGE treatment potentiated antioxidant capacity in increasing reduced glutathione levels, decreased oxidative stress marker, nitrotyrosine and limited hepatic necrosis in a mouse model of severe liver injuries (Ekong *et al.*, 2006). In the kidney, the downward RAP treatment effect on renal NADPH oxidase activity could suggest blunted basal oxidative stress in mice treated with RAGE antagonist that may explain the lower GPx activity in RAP-SS compared to vehicle-SS mice. This hypothesis is supported by a previous work showing reduced NADPH oxidase activity and nitrotyrosine levels in a glomerulosclerosis mouse model either knocked-out for RAGE or treated with sRAGE (Guo *et al.*, 2008). In these mice, RAGE blockade also ameliorated albuminuria and greatly limited glomerular sclerosis. Additionally, other studies reported decreased intracellular ROS after inhibition of RAGE with either RAGE-shRNA in renal fibroblasts (Chen *et al.*, 2010) or RAGE antibody in renal mesangial cells (Ide *et al.*, 2010). Surprisingly, no changes were detectable in the two oxidative stress markers and the two antioxidant enzymes activity we measured in the heart of sickle mice suggesting unaltered oxidant status in basal conditions. These results are consistent with a previous work from our team showing that MDA levels and GPx activity were similar at baseline between SAD (mild SS phenotype) mice and control mice but increased in response to

hypoxia/reoxygenation stress in sickle SAD mice (Charrin *et al.*, 2014). Collectively, our data strongly suggest that RAGE blockade is likely to ameliorate oxidative stress status, especially in the liver and kidney of sickle mice and further support the hypothesis of a reduced hemolysis after RAP treatment.

Nitric oxide bioavailability has been shown to be altered by endothelial activation, oxidative stress and hemolysis (Guzik *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2008). In our vehicle-SS mice, the greater eNOS mRNA expression in heart, liver and kidney could lead to a higher NO production in those organs as a compensatory mechanism for the impaired vascular function. This hypothesis is supported by previous works describing high levels of eNOS in β^{S+S} -Antilles and BERK cremaster muscle (Kaul *et al.*, 2000, 2004) and in NY1DD kidney (Bank *et al.*, 1996). However, simultaneously, authors showed altered microvascular reactivity to NO-mediated vasodilators (Acetylcholine and sodium nitroprusside) suggesting NO inactivation or inefficiency in sickle mice (Kaul *et al.*, 2000) corroborating the lack of increase in plasma NOx in our vehicle-SS compared to vehicle-AA mice. The higher oxidative stress found in these mice might be the consequence of an overproduction superoxide anion O_2^- which reacts with NO to produce peroxynitrite $ONOO^-$ and contributes to SCD vascular dysfunction (Chirico & Pialoux, 2012). Furthermore, RAGE activation has been demonstrated to reduce the half-life of endothelial NO synthase mRNA through an increased rate of mRNA degradation (Rojas *et al.*, 2000). RAGE inhibition improved renal eNOS mRNA expression and enhanced plasma NO production which are consistent with a previous study showing elevated aortic eNOS and NOx levels in sinoaortic denervated rats treated with sRAGE (Wu *et al.*, 2013). This finding might suggest a better renal NO bioavailability in sickle mice after RAGE blockade. The reduction of oxidative stress in the kidney of these mice may further support this hypothesis in that released NO is more unlikely to be scavenged by O_2^- .

In conclusion, our data suggest that specific inhibition of RAGE could blunt hemolysis which is reflected by the increase in hematocrit and RBC count and by the decrease in reticulocyte count. Both reduced oxidative stress markers and decreased pro-inflammatory cytokines expression might take part in lowering hemolytic process. Finally, lower hemolysis, upregulation of eNOS expression and increased plasma NO_x following RAGE blockade, may improve NO metabolism and thus the vascular function in severe SCD mice.

References

- Ahmed N (2005). Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* **67**, 3–21.
- Akohoue SA, Shankar S, Milne GL, Morrow J, Chen KY, Ajayi WU & Buchowski MS (2007). Energy Expenditure, Inflammation, and Oxidative Stress in Steady-State Adolescents With Sickle Cell Anemia. *Pediatr Res* **61**, 233–238.
- Arumugam T, Ramachandran V, Gomez SB, Schmidt AM & Logsdon CD (2012). S100P-Derived RAGE Antagonistic Peptide Reduces Tumor Growth and Metastasis. *Clin Cancer Res* **18**, 4356–4364.
- Balla G, Vercellotti GM, Muller-Eberhard U, Eaton J & Jacob HS (1991). Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* **64**, 648–655.
- Ballas SK & Mohandas N (1996). Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am* **10**, 1221–1239.
- Bangert A, Andrassy M, Müller A-M, Bockstahler M, Fischer A, Volz CH, Leib C, Göser S, Korkmaz-Icöz S, Zittrich S, Jungmann A, Lasitschka F, Pfitzer G, Müller OJ, Katus HA & Kaya Z (2016). Critical role of RAGE and HMGB1 in inflammatory heart disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E155-164.
- Bank N, Aynedjian HS, Qiu JH, Osei SY, Ahima RS, Fabry ME & Nagel RL (1996). Renal nitric oxide synthases in transgenic sickle cell mice. *Kidney Int* **50**, 184–189.
- Charrin E, Aufradet E, Douillard A, Romdhani A, Souza GD, Bessaad A, Faes C, Chirico EN, Pialoux V & Martin C (2014). Oxidative stress is decreased in physically active sickle cell SAD mice. *Br J Haematol* n/a-n/a.
- Chen S-C, Guh J-Y, Hwang C-C, Chiou S-J, Lin T-D, Ko Y-M, Huang J-S, Yang Y-L & Chuang L-Y (2010). Advanced glycation end-products activate extracellular signal-regulated kinase via the oxidative stress-EGF receptor pathway in renal fibroblasts. *J Cell Biochem* **109**, 38–48.
- Chirico EN & Pialoux V (2012). Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life* **64**, 72–80.
- Christaki E, Opal SM, Keith JC, Kessimian N, Palardy JE, Parejo NA, Tan XY, Piche-Nicholas N, Tchistiakova L, Vlasuk GP, Shields KM, Feldman JL, Lavallie ER, Arai M, Mounts W & Pittman DD (2011). A monoclonal antibody against RAGE alters gene expression and is protective in experimental models of sepsis and pneumococcal pneumonia. *Shock Augusta Ga* **35**, 492–498.
- Dasgupta T, Hebbel RP & Kaul DK (2006). Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. *Free Radic Biol Med* **41**, 1771–1780.

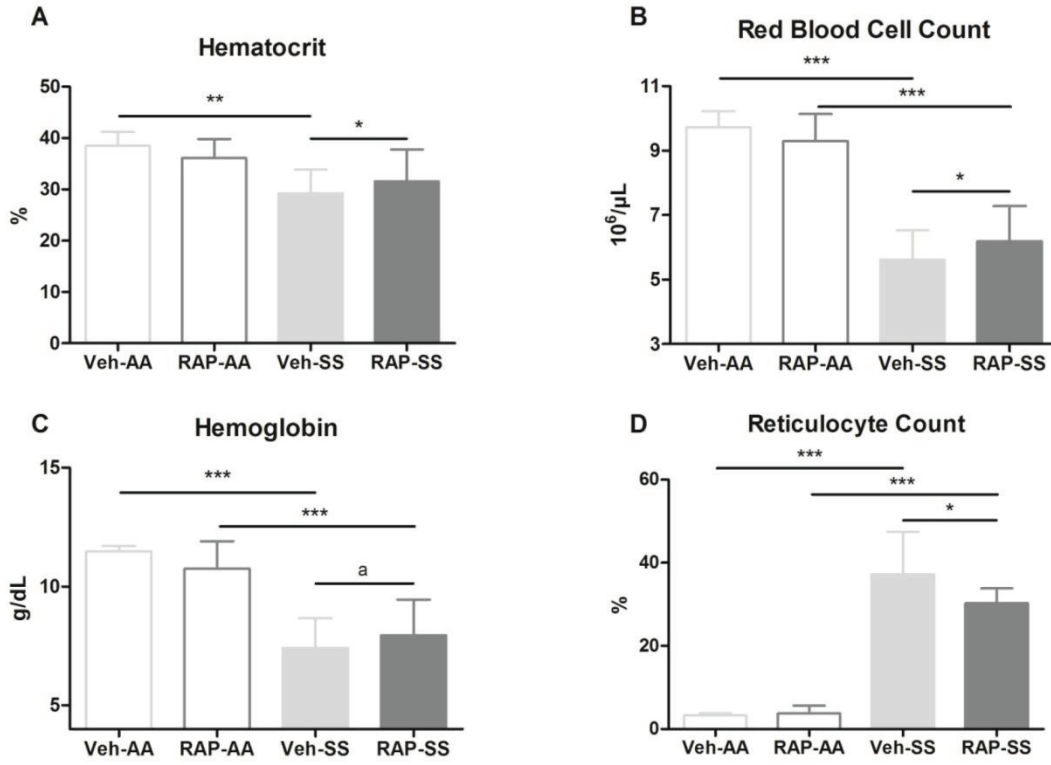
- Ekong U, Zeng S, Dun H, Feirt N, Guo J, Ippagunta N, Guarrera JV, Lu Y, Weinberg A, Qu W, Ramasamy R, Schmidt AM & Emond JC (2006). Blockade of the receptor for advanced glycation end products attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J Gastroenterol Hepatol* **21**, 682–688.
- Gao X, Zhang H, Schmidt AM & Zhang C (2008). AGE/RAGE produces endothelial dysfunction in coronary arterioles in Type 2 diabetic mice. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* **295**, H491–H498.
- Genuth S, Sun W, Cleary P, Sell DR, Dahms W, Malone J, Sivitz W, Monnier VM & Group* for the DSCAS (2005). Glycation and Carboxymethyllysine Levels in Skin Collagen Predict the Risk of Future 10-Year Progression of Diabetic Retinopathy and Nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial and Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Participants With Type 1 Diabetes. *Diabetes* **54**, 3103–3111.
- Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM & Creager MA (2006). Advanced Glycation End Products Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation* **114**, 597–605.
- Guo J, Ananthakrishnan R, Qu W, Lu Y, Reiniger N, Zeng S, Ma W, Rosario R, Yan SF, Ramasamy R, D'Agati V & Schmidt AM (2008). RAGE mediates podocyte injury in adriamycin-induced glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol JASN* **19**, 961–972.
- Guo WA, Knight PR & Raghavendran K (2012). The receptor for advanced glycation end products and acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* **38**, 1588–1598.
- Guzik TJ, Korb R & Adamek-Guzik T (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc* **54**, 469–487.
- Hartog JW, Voors AA, Bakker SJL, Smit AJ & van Veldhuisen DJ (2007). Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications. *Eur J Heart Fail* **9**, 1146–1155.
- Hebbel RP, Vercellotti GM & Nath KA (2009). A Systems Biology Consideration of the Vasculopathy of Sickle Cell Anemia: The Need for Multi-Modality Chemo-Prophylaxis. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* **9**, 271–292.
- Hegab Z, Gibbons S, Neyses L & Mamas MA (2012). Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. *World J Cardiol* **4**, 90–102.
- Hoppe CC (2014). Inflammatory Mediators of Endothelial Injury in Sickle Cell Disease. *Hematol Oncol Clin North Am* **28**, 265–286.
- Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H & Reusch JEB (2006). Diabetes and Advanced Glycoxidation End Products. *Diabetes Care* **29**, 1420–1432.
- Hyogo H & Yamagishi S (2008). Advanced glycation end products (AGEs) and their involvement in liver disease. *Curr Pharm Des* **14**, 969–972.
- Ide Y, Matsui T, Ishibashi Y, Takeuchi M & Yamagishi S (2010). Pigment epithelium-derived factor inhibits advanced glycation end product-elicited mesangial cell damage by blocking NF- κ B activation. *Microvasc Res* **80**, 227–232.
- Kato GJ, Gladwin MT & Steinberg MH (2007). Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev* **21**, 37–47.

- Kaul DK & Hebbel RP (2000). Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest* **106**, 411–420.
- Kaul DK, Liu X, Chang H-Y, Nagel RL & Fabry ME (2004). Effect of fetal hemoglobin on microvascular regulation in sickle transgenic-knockout mice. *J Clin Invest* **114**, 1136–1145.
- Kaul DK, Liu X-D, Fabry ME & Nagel RL (2000). Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in transgenic sickle mouse. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* **278**, H1799–H1806.
- Koyama Y, Takeishi Y, Arimoto T, Niizeki T, Shishido T, Takahashi H, Nozaki N, Hirono O, Tsunoda Y, Nitobe J, Watanabe T & Kubota I (2007). High serum level of pentosidine, an advanced glycation end product (AGE), is a risk factor of patients with heart failure. *J Card Fail* **13**, 199–206.
- Krishnan S, Setty Y, Betal SG, Vijender V, Rao K, Dampier C & Stuart M (2010). 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.
- Meerwaldt R, Links T, Zeebregts C, Tio R, Hillebrands J-L & Smit A (2008). The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. *Cardiovasc Diabetol* **7**, 29.
- Meloche J, Courchesne A, Barrier M, Carter S, Bissierier M, Paulin R, Lauzon-Joset J-F, Breuils-Bonnet S, Tremblay É, Biardel S, Racine C, Courture C, Bonnet P, Majka SM, Deshaies Y, Picard F, Provencher S & Bonnet S (2013). Critical role for the advanced glycation end-products receptor in pulmonary arterial hypertension etiology. *J Am Heart Assoc* **2**, e005157.
- Miyata T, Ishiguro N, Yasuda Y, Ito T, Nangaku M, Iwata H & Kurokawa K (1998). Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers. *Biochem Biophys Res Commun* **244**, 45–49.
- Nur E, Brandjes DP, Schnog J-JB, Otten H-M, Fijnvandraat K, Schalkwijk CG, Biemond BJ & Group the CS (2010). Plasma levels of advanced glycation end products are associated with haemolysis-related organ complications in sickle cell patients. *Br J Haematol* **151**, 62–69.
- Oberley LW & Spitz DR (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol* **105**, 457–464.
- Paglia DE & Valentine WN (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* **70**, 158–169.
- Pialoux V, Mounier R, Brown AD, Steinback CD, Rawling JM & Poulin MJ (2009). Relationship between oxidative stress and HIF-1 α mRNA during sustained hypoxia in humans. *Free Radic Biol Med* **46**, 321–326.
- Rees DC, Williams TN & Gladwin MT (2010). Sickle-cell disease. *The Lancet* **376**, 2018–2031.
- Rojas A, Romay S, González D, Herrera B, Delgado R & Otero K (2000). Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression by Albumin-Derived Advanced Glycosylation End Products. *Circ Res* **86**, e50–e54.

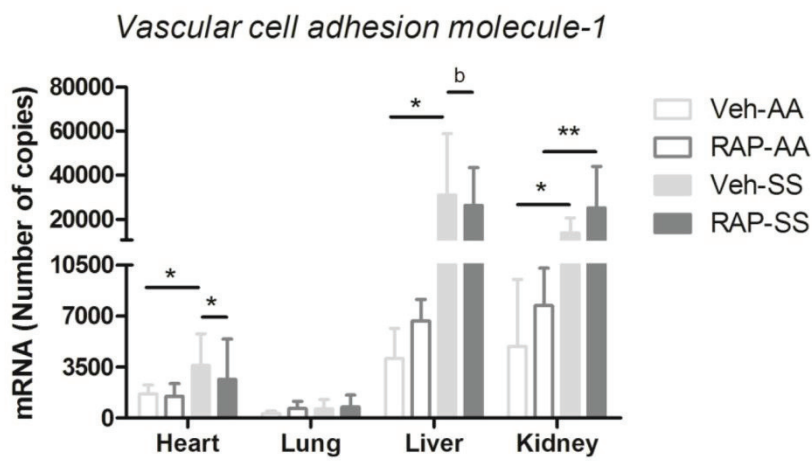
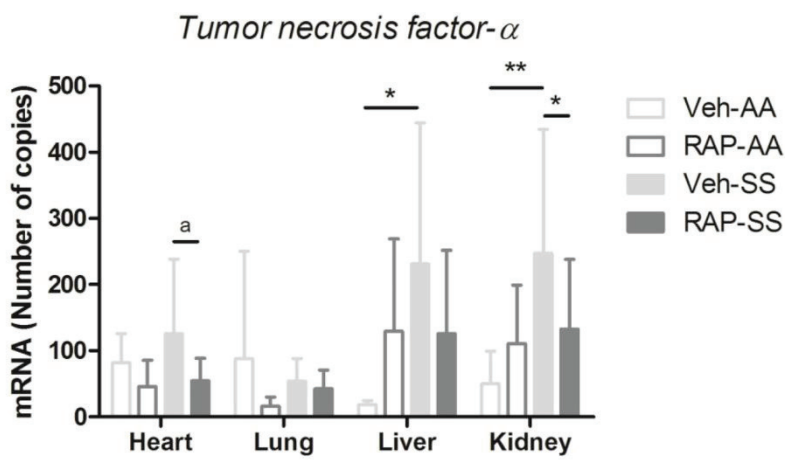
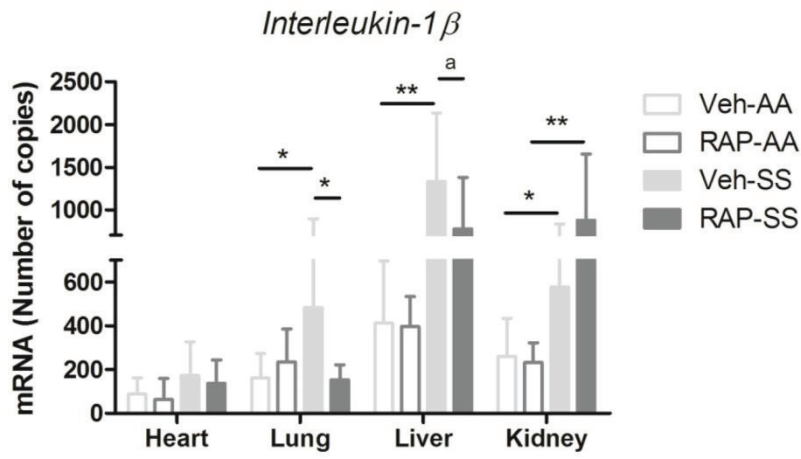
- Santos JC de F, Valentim IB, de Araújo ORP, Ataíde T da R & Goulart MOF (2013). Development of Nonalcoholic Hepatopathy: Contributions of Oxidative Stress and Advanced Glycation End Products. *Int J Mol Sci* **14**, 19846–19866.
- Singh R, Barden A, Mori T & Beilin L (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* **44**, 129–146.
- Somjee SS, Warriar RP, Thomson JL, Ory-Ascani J & Hempe JM (2005). Advanced glycation end-products in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* **128**, 112–118.
- Sparkenbaugh E & Pawlinski R (2013). Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease. *Br J Haematol*; DOI: 10.1111/bjh.12336.
- Tan ALY, Forbes JM & Cooper ME (2007). AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* **27**, 130–143.
- Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, Adema G, van Kooyk Y, de Witte T & Figdor CG (2001). Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood* **98**, 1802–1811.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P & Descamps-Latscha B (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* **49**, 1304–1313.
- Wood KC, Hsu LL & Gladwin MT (2008). Sickle cell disease vasculopathy: A state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med* **44**, 1506–1528.
- Wu F, Feng J-Z, Qiu Y-H, Yu F-B, Zhang J-Z, Zhou W, Yu F, Wang G-K, An L-N, Ni F-H, Wu H, Zhao X-X, Qin Y-W & Luo H-D (2013). Activation of receptor for advanced glycation end products contributes to aortic remodeling and endothelial dysfunction in sinoaortic denervated rats. *Atherosclerosis* **229**, 287–294.
- Zeng S, Dun H, Ippagunta N, Rosario R, Zhang QY, Lefkowitz J, Yan SF, Schmidt AM & Emond JC (2009). Receptor for advanced glycation end product (RAGE)-dependent modulation of early growth response-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Hepatol* **50**, 929–936.
- Zhang H, Tasaka S, Shiraishi Y, Fukunaga K, Yamada W, Seki H, Ogawa Y, Miyamoto K, Nakano Y, Hasegawa N, Miyasho T, Maruyama I & Ishizaka A (2008). Role of Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products on Endotoxin-induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* **178**, 356–362.

	AA-Veh	AA-RAP	SS-Veh	SS-RAP
MCV (fL)	39.7 ± 1.0	38.8 ± 1.2	52.3 ± 3.5***	50.9 ± 2.0†††
RDW (%)	15.0 ± 0.5	14.7 ± 1.2	22.7 ± 1.4***	22.5 ± 1.6†††
MCHC (g/dL)	30.6 ± 0.6	29.7 ± 1.0	25.2 ± 1.1***	25.2 ± 0.9†††
MCH (pg)	12.0 ± 0.1	11.5 ± 0.6	13.2 ± 0.7*	12.9 ± 0.7††
WBC (10 ³ /μL)	4.2 ± 1.3	2.6 ± 0.6	38.4 ± 11.3***	44.9 ± 10.6†††
Lymphocytes (10 ³ /μL)	3.3 ± 1.1	2.0 ± 0.5	34.7 ± 10.3***	40.7 ± 9.5†††
Monocytes (10 ³ /μL)	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.0	1.8 ± 0.8***	1.8 ± 0.7††
Granulocytes (10 ³ /μL)	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1	1.9 ± 1.0***	2.3 ± 1.3†††
Platelets (10 ³ /μL)	2351.7 ± 253.9	2234.8 ± 284.0	937.3 ± 266.6***	1007.0 ± 134.7†††
MPV (fL)	13.0 ± 0.2	13.2 ± 0.6	10.0 ± 1.1***	10.2 ± 0.8†††
Sickled cells (%)	-	-	11.3 ± 5.2	8.7 ± 3.3

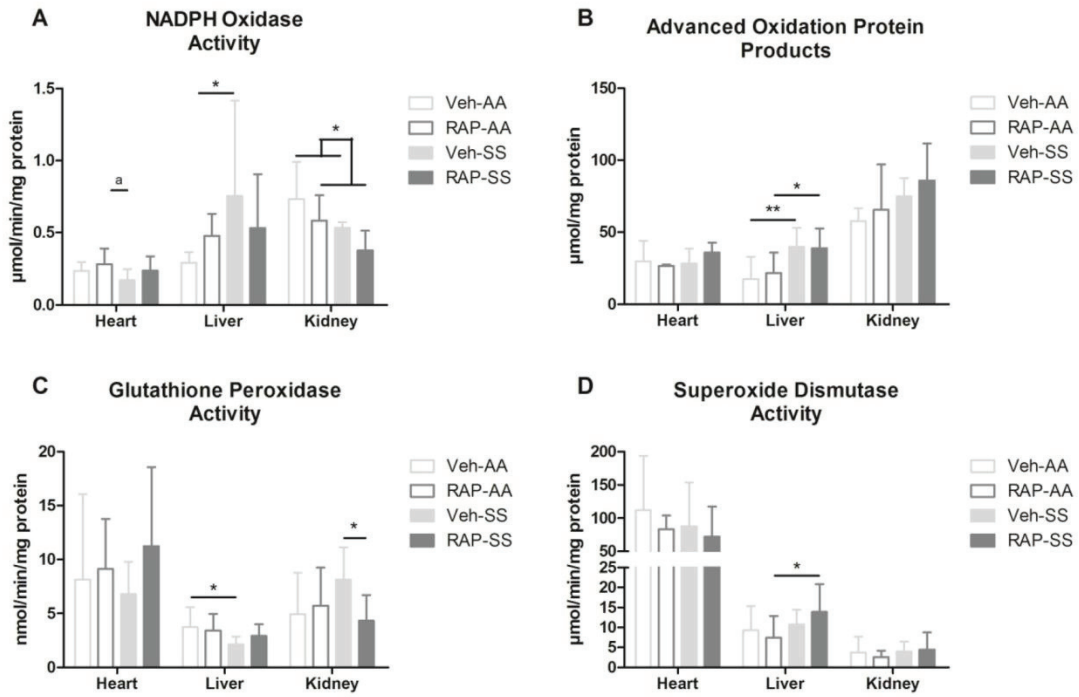
*($p < 0.05$), ***($p < 0.001$) vs AA-Veh ; ††($p < 0.01$), †††($p < 0.001$) vs AA-RAP



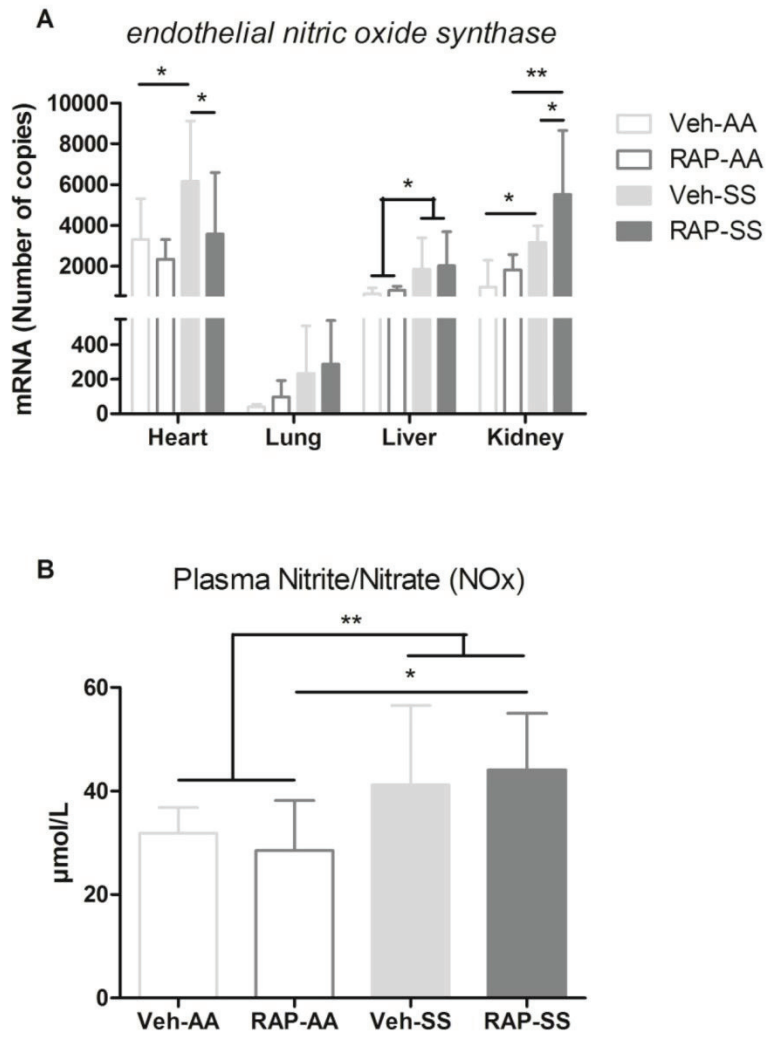
*($p < 0.05$), ***($p < 0.001$), ^a($p = 0.09$)



*($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ^a($p = 0.08$), ^b($p = 0.06$)



*($p < 0.05$), **($p < 0.01$)



*($p < 0.05$), **($p < 0.01$)

Allant dans le même sens que les résultats de l'étude 2, les souris SS traitées avec la solution saline (Veh-SS) affichaient un hémocrite significativement inférieur à celui des souris saines AA. De façon plus surprenante, l'hémocrite chez les souris SS traitées avec le RAP (RAP-SS) était restauré à un niveau similaire à celui d'une souris AA. Les souris RAP-SS présentaient également un nombre de GRs plus élevé et un nombre de réticulocytes significativement inférieurs aux souris Veh-SS. Considérés ensemble, ces résultats pourraient suggérer une atténuation des processus hémolytiques suite à l'inhibition des RAGEs chez les souris SS. Ainsi l'activation du RAGE pourrait jouer un rôle dans l'hyperhémolyse observée chez les souris SS. Il est toutefois nécessaire de prendre des précautions face à cette hypothèse dans la mesure où les marqueurs d'hémolyse n'ont pas été quantifiés. Alors que l'expression d'IL-1 β , TNF- α et VCAM-1 était supérieure dans le foie, le rein et le cœur des souris Veh-SS par rapport aux Veh-AA, chez les RAP-SS, l'expression de certaines de ces molécules était normalisée à une valeur semblable à celle des RAP-AA (*i.e.* IL-1 β dans le poumon et le foie; TNF- α dans le cœur, le foie et le rein; VCAM-1 dans le cœur et le foie). Ces résultats suggèrent alors que l'inhibition des RAGEs pourrait réduire la production de ces médiateurs pro-inflammatoires et d'adhérence vasculaire chez les souris SS. L'activation du récepteur jouerait donc un rôle important dans l'inflammation chez ces souris. Les effets du traitement RAP sur le stress oxydant sont visibles surtout au niveau du foie et du rein. Au niveau hépatique, l'activité NADPH oxydase et la concentration en AOPP sont supérieures chez les Veh-SS comparées aux Veh-AA. Cette augmentation de marqueurs du stress oxydant chez les Veh-SS est associée à une baisse de l'activité antioxydante de la GPx, corroborant là encore, les résultats de l'étude 2. Chez les RAP-SS, la concentration hépatique en AOPP est supérieure à celle des RAP-AA tout comme l'activité antioxydante de la SOD alors que cette dernière ne varie pas entre les Veh-AA et les Veh-SS. Ce résultat pourrait suggérer une réponse plus efficace des souris traitées au RAP face aux attaques oxydantes répétées en activant plus fortement leur système antioxydant hépatique. Dans le rein, les souris traitées au RAP présentent une activité NADPH oxydase

diminuée par rapport aux souris traitées à la solution saline. Ce résultat suggère une modulation du stress oxydant rénal par les RAGEs chez les souris drépanocytaires. L'inhibition pharmacologique de ces derniers pourrait alors limiter les dégâts oxydatifs rénaux associés aux dysfonctions rénales observées dans cette maladie (e.g. glomérulopathie, insuffisance rénale, etc. ; cf. I.B.5.d.). Cette diminution du stress oxydant rénal basal pourrait également expliquer la diminution de l'activité antioxydante de GPx observée chez les RAP-SS par rapport aux Veh-SS. L'expression rénale ARNm d'eNOS était supérieure chez les Veh-SS et RAP-SS comparées à leurs contrôles sains respectifs Veh-AA et RAP-AA. En revanche, la concentration plasmatique en NOx n'était augmentée que chez les RAP-SS par rapport aux RAP-AA. Ainsi malgré la stimulation compensatoire d'eNOS pour faire face à une fonction endothéliale altérée, l'augmentation concomitante du stress oxydant pourrait entraîner une inactivation du NO par sa réaction avec l'anion superoxyde donnant du peroxyde d'azote, ONOO⁻, expliquant l'absence d'augmentation des NOx plasmatiques chez les Veh-SS par rapport aux Veh-AA. A l'inverse, la diminution des processus pro-oxydants rénaux et l'élévation d'eNOS pourrait augmenter la biodisponibilité en NO grâce à une moindre inactivation de ce dernier par les ROS et *a fortiori* une formation d'ONOO⁻ réduite chez les souris RAP-SS. Au final, l'augmentation de la biodisponibilité du NO pourrait avoir un effet bénéfique sur la fonction endothéliale rénale chez les souris RAP-SS.

Pour conclure, les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que les RAGEs pourraient jouer un rôle important dans la physiopathologie drépanocytaire en exacerbant les processus hémolytiques, pro-oxydants, pro-inflammatoires et en diminuant le métabolisme du NO. Cette hypothèse est appuyée par les résultats obtenus après blocage de ces récepteurs. En effet, l'inhibition pharmacologique des RAGEs entraîne une augmentation de l'hématocrite, du nombre de GRs et une diminution du nombre de réticulocytes. Après blocage des RAGEs, la diminution conjointe des marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation pourrait également

participer à réduire l'hémolyse. Ajouté à cela, l'augmentation de l'expression d'eNOS et de la concentration plasmatique en métabolites du NO pourraient suggérer une amélioration du métabolisme du NO voire de la fonction vasculaire chez le modèle murin Townes. Ces résultats restent, toutefois, à confirmer, notamment par le biais de mesures fonctionnelles des différents organes ciblés chez les souris drépanocytaires.

PARTIE 4

—

CONCLUSION GÉNÉRALE et Perspectives



Conclusion Générale

L'objectif de ce travail de thèse était d'explorer les conséquences physiopathologiques de l'utilisation d'un entraînement sportif ou d'un traitement pharmacologique dans la drépanocytose dans le but d'enrichir la connaissance de la maladie et d'envisager d'éventuelles nouvelles thérapies.

La première partie de ce travail a consisté à étudier les réponses inflammatoires, de la balance oxydative et du métabolisme du NO en réponse à l'entraînement chez deux modèles murins de la drépanocytose, l'un étant relativement asymptomatique en conditions basales (modèle SAD), l'autre étant particulièrement sévère même à l'état stable (modèle Townes). Il ressort de la première étude qu'un entraînement volontaire sur roue d'activité améliore la biodisponibilité pulmonaire du NO et limite le stress oxydant cardiaque en réponse à un stress vaso-occlusif déclenché chez les souris SAD (Etude 1; Figure 32). Cependant, les caractéristiques phénotypiques de ce modèle s'approchant de celles des sujets PTD plutôt que de celles des patients homozygotes, ainsi que la variabilité importante dans la quantité d'activité physique réalisée entre les souris, nous ont amené à concevoir un second protocole d'entraînement sur un modèle plus sévère et donc plus proche de la maladie humaine et dont l'intensité était contrôlée (Etude 3). Ainsi, ce travail reposait sur une analyse plus complète des effets de l'entraînement chez des souris transgéniques porteuses homozygotes de la mutation β^S humaine. Les multiples constatations positives qui en émergent sont i) une moindre désoxygénation veineuse au repos, ii) une réduction de l'inflammation systémique et rénale, iii) une atténuation de la congestion splénique, en réponse aux 8 semaines d'entraînement sur tapis roulant (Figure 32). Ces données pourraient alors avoir un impact fort étant donné qu'elles bouleversent le dogme selon lequel l'activité physique aurait des effets néfastes chez les patients drépanocytaires (homozygotes).

La seconde partie portait sur la voie de régulation du RAGE, impliqué dans les mécanismes inflammatoires, du stress oxydant et du métabolisme du NO chez les souris drépanocytaires Townes. Bien qu'à ce jour, l'intérêt porté à ce récepteur soit minime dans la drépanocytose, les nombreuses similitudes entre les complications liées à cette maladie et celles induites par l'activation du RAGE, nous ont amené à nous intéresser à cette voie. En effet, l'interaction AGE/RAGE est connue pour participer aux altérations de la filtration rénale et au développement d'une glomérulopathie (Ahmed, 2005; Tan et al., 2007), à la fibrose et à la cirrhose hépatique (Hyogo and Yamagishi, 2008; Santos et al., 2013), aux dysfonctions cardiovasculaires (Hartog et al., 2007; Hegab et al., 2012) et à l'hypertension pulmonaire (Meloche et al., 2013) dans diverses maladies chroniques. Ainsi, les résultats de cette 4^{ème} étude mettent en évidence, chez des souris SS traitées avec un antagoniste du RAGE, une augmentation de l'hématocrite et du nombre de globules rouges, associée à une diminution du pourcentage de réticulocytes qui, ensemble, pourraient suggérer un effet positif limitant l'hémolyse. La baisse d'expression de molécules de l'inflammation et de marqueurs du stress oxydant ainsi que l'amélioration du métabolisme du NO, principalement dans le foie et le rein (et dans une moindre mesure dans le cœur) des souris traitées au RAP appuient l'hypothèse de l'implication clé des RAGEs dans la physiopathologie drépanocytaire (Figure 32).

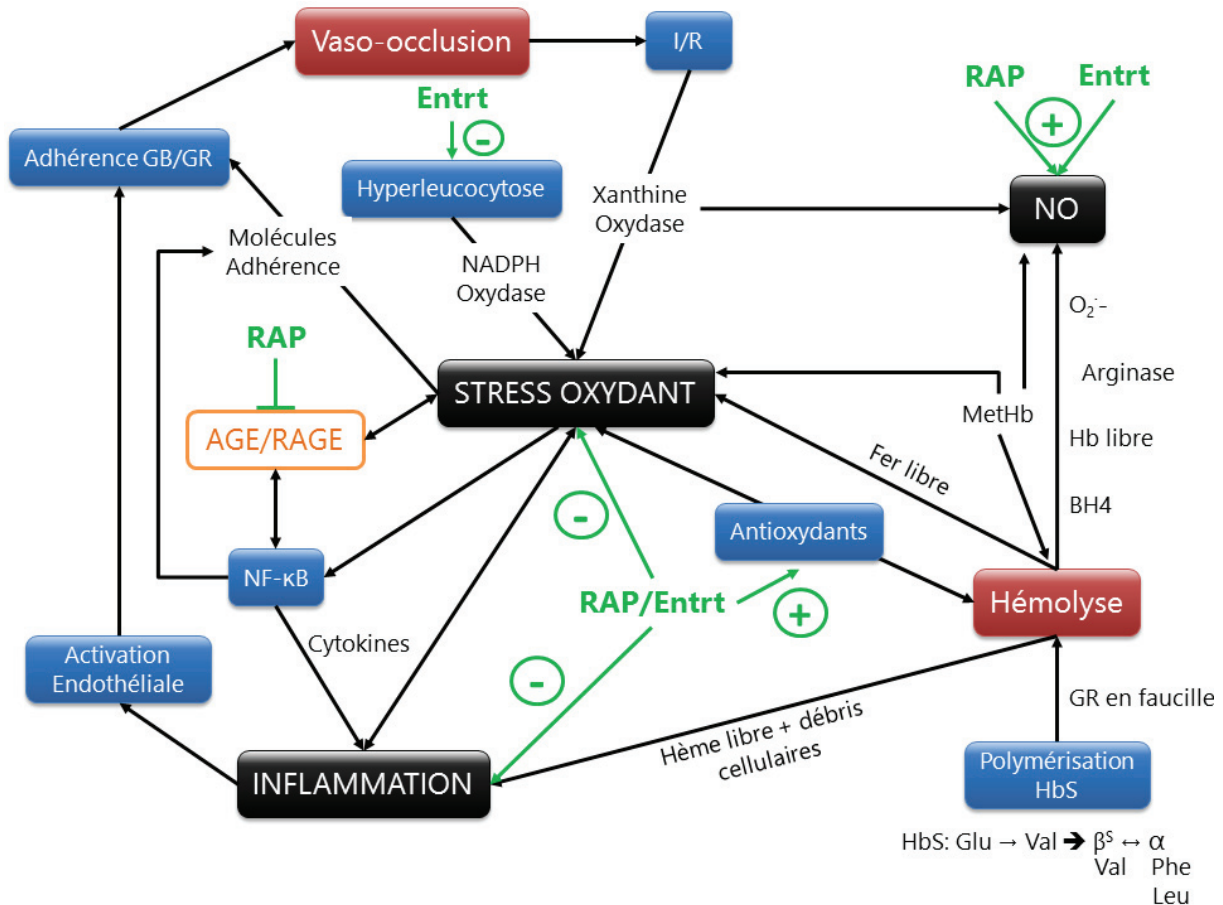


Figure 32. Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans les études portant sur les deux traitements appliqués chez les souris transgéniques drépanocytaires.

En noir, sont identifiés les paramètres généraux qui sont modulés par l'entraînement et/ou les RAGEs. Sont représentés en rouge les manifestations cliniques de la maladie et en bleu les mécanismes moléculaires associés. Les approches utilisées et leurs possibles effets sont indiqués en vert. Le « + » représente un effet activateur supposé, le « - » représente un effet inhibiteur supposé. **GB** : Globules Blancs ; **GR** : Globules Rouges ; **RAP** : RAGE Antagonist Peptide ; **AGE** : Advanced Glycation End products ; **RAGE** : Receptor of AGE ; **NF-κB** : Nuclear Factor-κB ; **I/R** : Ischémie/Reperfusion ; **Entrt** : Entraînement ; **NO** : Oxyde Nitrique ; **O₂⁻** : Anion superoxyde ; **MetHb** : Methémoglobine ; **BH4** : Tétrahydrobioptérine ; **HbS** : Hémoglobine S ; **Glu** : Acide glutamique ; **Val** : Valine ; **Phe** : Phénylalanine ; **Leu** : Leucine.

Perspectives

Considérant que l'intérêt porté au RAGE est encore modeste aujourd'hui mais que les premiers résultats que nous avons obtenus sont prometteurs et corroborent l'hypothèse de départ, des analyses plus approfondies devraient être envisagées. Dans un premier temps, il semble nécessaire de vérifier si la réduction des processus hémolytiques, inflammatoires et oxydatifs suite au blocage de RAGEs améliore la fonction de chaque organe. Pour ce faire, il serait intéressant de réaliser une exploration structurale des tissus impactés grâce à des coupes histologiques associées à des dosages de marqueurs de dégâts tissulaires spécifiques (*e.g.* alanine transaminase dans le foie, créatinine phosphokinase dans le cœur, azote uréique sanguin dans le rein) (Tan et al., 2016) chez des souris SS ayant reçues l'inhibiteur RAP. Ensuite, un examen *in situ* de l'adhérence vasculaire par microscopie intravitale chez des souris traitées au RAP, apporterait de précieux éléments de réponse quant au rôle des RAGEs sur les processus inflammatoires et d'activation endothéliale et par conséquent, sur le risque de formation d'occlusions vasculaires. Dans le but de confirmer les effets bénéfiques de l'inhibition des RAGEs sur la fonction microvasculaire, il serait utile de réaliser des mesures *in vivo* de réactivité endothéliale par laser doppler couplé à une iontophorèse transcutanée, mode d'administration locale de composés modulant la vasomotricité (*e.g.* acétylcholine, dérivés du NO) (Sigaud-Roussel et al., 2004), chez des souris traitées au RAP. Ces informations permettraient de déterminer le rôle éventuel des RAGEs dans la survenue d'événements ischémiques à la sortie du lit capillaire dans les organes. L'utilisation de souris KO pour RAGE portant la mutation drépanocytaire permettrait de s'assurer de la spécificité du rôle joué par les RAGEs dans la maladie et de connaître son rôle dans la pathogenèse de la drépanocytose. On pourrait alors envisager d'effectuer, en sus des mesures de survie, des marqueurs de l'inflammation, du stress oxydant, du métabolisme du NO associés à des études histologiques des organes majeurs et de la fonction vasculaire à différentes périodes du développement de ces souris chimères

drépanocytaires RAGE^{-/-}. Enfin, d'un point de vue thérapeutique, il serait intéressant de tester d'autres peptides antagonistes des RAGEs afin de déterminer le composé ayant les effets les plus favorables sur la maladie. Parmi ces composés à valider, l'Azeliagon développé par vTv Therapeutics est actuellement en phase 3 d'essai clinique chez des patients Alzheimer (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02080364>). Cet inhibiteur ferait alors un excellent candidat à tester dans le traitement de la drépanocytose à conditions que son utilisation soit approuvée par les services de santé et qu'elle montre une action thérapeutique efficace et sans danger.

Les résultats des études 3 et 4 se complètent au regard de plusieurs paramètres : l'entraînement conduit, entre autres, à une réduction du nombre de leucocytes et de l'expression rénale ARNm d'IL-1 β dans l'étude 3 ; l'inhibition des RAGEs entraîne quant à elle, une baisse de l'expression cardiaque ARNm de VCAM-1 et du nombre de réticulocytes associée à une augmentation de l'hématocrite et du nombre de GRs dans l'étude 4. Il pourrait alors s'avérer intéressant de tester la combinaison des deux traitements sur la physiopathologie drépanocytaire chez le modèle murin Townes afin de déterminer si l'un potentialise l'autre et d'envisager de les utiliser conjointement dans le but de bénéficier de leurs effets positifs respectifs.

Les études 3 et 4 ont été effectuées chez le modèle Townes à l'état stable. Cependant le rôle potentiel de l'entraînement physique et/ou de l'implication des RAGEs en cas de CVOs chez les souris demeure inconnu à ce jour. Le déclenchement d'un stress vaso-occlusif via l'utilisation de l'hypoxie/réoxygénation (Aufradet et al., 2013), d'injection d'hème (Ghosh et al., 2013), ou de LPS (Holtzclaw et al., 2004), apporterait des informations supplémentaires sur l'impact de l'entraînement physique et/ou du rôle des RAGEs sur le risque de survenue et la sévérité des CVOs dans la drépanocytose.

Etant donné que la totalité des études ont été réalisées sur des modèles murins, il semble aussi indispensable de vérifier la transférabilité des résultats

obtenus chez l'Homme. Ainsi, un protocole d'entraînement en endurance sur ergocycle à intensité proche du SV1 est actuellement en cours dans le cadre d'une collaboration entre le centre de référence des syndromes drépanocytaires à l'hôpital Henri Mondor de Créteil et l'équipe de « biologie vasculaire et du globule rouge » du LIBM, EA 7424 basée sur les sites de l'université Jean Monnet à Saint-Etienne et de l'université Savoie-Mont Blanc à Chambéry. L'étude des paramètres métaboliques, d'aptitude physique, musculaires et des dosages plasmatiques de marqueurs inflammatoires et du stress oxydant pourrait apporter des nombreuses réponses quant à l'efficacité et à l'innocuité d'un tel programme chez des patients drépanocytaires.

PARTIE 5

-

Références Bibliographiques



A

- Abiodun, M. E., Uadia, P. O. and Kuliya-Gwarzo, A.** (2010). Antioxidant Enzymes and Acute Phase Proteins Correlate with Marker of Lipid Peroxide in Adult Nigerian Sickle Cell Disease Patients. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **13**, 177–182.
- ACSM and NCAA Joint Statement on Sickle Cell Trait and Exercise** (2013). *NCAAorg - Off. Site NCAA*.
- Adewoyin, A. S. and Obieche, J. C.** (2014). Hypertransfusion Therapy in Sickle Cell Disease in Nigeria. *Adv. Hematol.* **2014**, e923593.
- Ahmed, N.** (2005). Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **67**, 3–21.
- Akimoto, T., Furudate, M., Saitoh, M., Sugiura, K., Waku, T., Akama, T. and Kono, I.** (2002). Increased plasma concentrations of intercellular adhesion molecule-1 after strenuous exercise associated with muscle damage. *Eur. J. Appl. Physiol.* **86**, 185–190.
- Akinsheye, I., Alsultan, A., Solovieff, N., Ngo, D., Baldwin, C. T., Sebastiani, P., Chui, D. H. K. and Steinberg, M. H.** (2011). Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood* **118**, 19–27.
- Akira, S., Hirano, T., Taga, T. and Kishimoto, T.** (1990). Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J.* **4**, 2860–2867.
- Akohoue, S. A., Shankar, S., Milne, G. L., Morrow, J., Chen, K. Y., Ajayi, W. U. and Buchowski, M. S.** (2007). Energy Expenditure, Inflammation, and Oxidative Stress in Steady-State Adolescents With Sickle Cell Anemia. *Pediatr. Res.* **61**, 233–238.
- Akova, B., Sürmen-Gür, E., Gür, H., Dirican, M., Sarandöl, E. and Küçükoglu, S.** (2001). Exercise-induced oxidative stress and muscle performance in healthy women: role of vitamin E supplementation and endogenous oestradiol. *Eur. J. Appl. Physiol.* **84**, 141–147.
- Alameri, H. F., Aleem, A., Kardas, W., Jehangir, A., Owais, M. and Al-Momen, A.** (2008). Dyspnea, pulmonary function and exercise capacity in adult Saudi patients with sickle cell disease. *Saudi Med. J.* **29**, 707–713.
- Alcorn, R., Bowser, B., Henley, E. J. and Holloway, V.** (1984). Fluidotherapy and exercise in the management of sickle cell anemia. A clinical report. *Phys. Ther.* **64**, 1520–1522.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E. and Knowles, R. G.** (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357**, 593–615.
- Alessio, H. M., Goldfarb, A. H. and Cao, G.** (1997). Exercise-induced oxidative stress before and after vitamin C supplementation. *Int. J. Sport Nutr.* **7**, 1–9.
- Alhwiesh, A.** (2014). An update on sickle cell nephropathy. *Saudi J. Kidney Dis. Transplant. Off. Publ. Saudi Cent. Organ Transplant. Saudi Arab.* **25**, 249–265.
- Alkaitis, M. S. and Crabtree, M. J.** (2012). Recoupling the Cardiac Nitric Oxide Synthases: Tetrahydrobiopterin Synthesis and Recycling. *Curr. Heart Fail. Rep.* **9**, 200–210.

- Alsultan, A. I., Seif, M. A., Amin, T. T., Naboli, M. and Alsuliman, A. M.** (2010). Relationship between oxidative stress, ferritin and insulin resistance in sickle cell disease. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **14**, 527–538.
- Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E. and Hochstein, P.** (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 6858–6862.
- Anele, U. A., Morrison, B. F. and Burnett, A. L.** (2015). Molecular Pathophysiology of Priapism: Emerging Targets. *Curr. Drug Targets* **16**, 474–483.
- 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., et al.** (2007). Hemodynamic and Functional Assessment of Patients with Sickle Cell Disease and Pulmonary Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 1272–1279.
- Anwar-Mohamed, A., Degenhardt, O. S., El Gendy, M. A. M., Seubert, J. M., Kleeberger, S. R. and El-Kadi, A. O. S.** (2011). The effect of Nrf2 knockout on the constitutive expression of drug metabolizing enzymes and transporters in C57Bl/6 mice livers. *Toxicol. In Vitro* **25**, 785–795.
- Anzalone, M. L., Green, V. S., Buja, M., Sanchez, L. A., Harrykissoon, R. L. and Eichner, E. R.** (2010). Sickle cell trait and fatal rhabdomyolysis in football training: a case study. *Med. Sci. Sports Exerc.* **42**, 3–7.
- Arnér, E. S. J. and Holmgren, A.** (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6102–6109.
- Asare, K., Gee, B. E., Stiles, J. K., Wilson, N. O., Driss, A., Quarshie, A., Adams, R. J., Kutlar, A. and Hibbert, J. M.** (2010). Plasma interleukin-1 β concentration is associated with stroke in sickle cell disease. *Cytokine* **49**, 39–44.
- Aslan, M. and Freeman, B. A.** (2007). Redox-Dependent Impairment of Vascular Function in Sickle Cell Disease. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 1469–1483.
- 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., et al.** (2001). Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 15215–15220.
- ATS Statement** (2002). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 111–117.
- Aufradet, E., Monchanin, G., Oyonno-Enguelle, S., Féasson, L., Messonnier, L., Francina, A., Bezin, L., Serpero, L. D., Gozal, D., Dodogba, M., et al.** (2010). Habitual Physical Activity and Endothelial Activation in Sickle Cell Trait Carriers. *Med. Sci. Sports Exerc.* **42**, 1987–1994.
- Aufradet, E., DeSouza, G., Bourgeaux, V., Bessaad, A., Champion, Y., Canet-Soulas, E., Pialoux, V., Chirico, E. N., Chevrier, A.-M., Godfrin, Y., et al.** (2013). Hypoxia/reoxygenation stress increases markers of vaso-occlusive crisis in sickle SAD mice. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **54**, 297–312.
- Aufradet, E., Douillard, A., Charrin, E., Romdhani, A., De Souza, G., Bessaad, A., Faes, C., Bourgeaux, V., Chirico, E. N., Canet-Soulas, E., et al.** (2014). Physical activity limits pulmonary endothelial activation in sickle cell SAD mice. *Blood* **123**, 2745–2747.

Ayala, A., Munoz, M. F. and Arguelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal, Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Med. Cell. Longev. Oxidative Med. Cell. Longev.* **2014, 2014**, e360438

B

Babior, B. M. (1984). The respiratory burst of phagocytes. *J. Clin. Invest.* **73**, 599–601.

Balakrishnan, S. D. and Anuradha, C. V. (1998). Exercise, depletion of antioxidants and antioxidant manipulation. *Cell Biochem. Funct.* **16**, 269–275.

Balayssac-Siransy, E., Connes, P., Tuo, N., Danho, C., Diaw, M., Sanogo, I., Hardy-Dessources, M.-D., Samb, A., Ballas, S. K. and Bogui, P. (2011). Mild haemorheological changes induced by a moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia. *Br. J. Haematol.* **154**, 398–407.

Balkwill, F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 361–371.

Ballas, S. K. (1995). The Sick Cell Painful Crisis in Adults: Phs and Objective Signs. *Hemoglobin* **19**, 323–333.

Ballas, S. K. and Mohandas, N. (1996). Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **10**, 1221–1239.

Bandeira, I. C. J., Rocha, L. B. S., Barbosa, M. C., Elias, D. B. D., Querioz, J. A. N., Freitas, M. V. C. and Gonçalves, R. P. (2014). Chronic inflammatory state in sickle cell anemia patients is associated with HBB*S haplotype. *Cytokine* **65**, 217–221.

Banerjee, S., Owen, C. and Chopra, S. (2001). Sick cell hepatopathy. *Hepatology* **33**, 1021–1028.

Bao, B., Prasad, A. S., Beck, F. W. J., Snell, D., Suneja, A., Sarkar, F. H., Doshi, N., Fitzgerald, J. T. and Swerdlow, P. (2008). Zinc supplementation decreases oxidative stress, incidence of infection, and generation of inflammatory cytokines in sickle cell disease patients. *Transl. Res.* **152**, 67–80.

Barabino, G. A., McIntire, L. V., Eskin, S. G., Sears, D. A. and Udden, M. (1987). Rheological studies of erythrocyte-endothelial cell interactions in sickle cell disease. *Prog. Clin. Biol. Res.* **240**, 113–127.

Barabino, G. A., Platt, M. O. and Kaul, D. K. (2010). Sick Cell Biomechanics. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **12**, 345–367.

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. and Gutin, B. (2001). Exercise in Sick Cell Anemia: Effect on Inflammatory and Vasoactive Mediators. *Endothelium* **8**, 147–155.

Barcroft, J. and King, W. O. R. (1909). The effect of temperature on the dissociation curve of blood. *J. Physiol.* **39**, 374–384.

Bargoma, E. M., Mitsuyoshi, J. K., Larkin, S. K., Styles, L. A., Kuypers, F. A. and Test, S. T. (2005). Serum C-reactive protein parallels secretory phospholipase A2 in sickle cell disease patients with vasoocclusive crisis or acute chest syndrome. *Blood* **105**, 3384–3385.

- Barros, A. I. R. N. A., Nunes, F. M., Gonçalves, B., Bennett, R. N. and Silva, A. P.** (2011). Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chem.* **128**, 165–172.
- 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., et al.** (2010). 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**, 426–435.
- Basta, G.** (2008). Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis* **196**, 9–21.
- Basta, G., Schmidt, A. M. and Caterina, R. D.** (2004). Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc. Res.* **63**, 582–592.
- Basta, G., Lazzerini, G., Turco, S. D., Ratto, G. M., Schmidt, A. M. and Caterina, R. D.** (2005). At Least 2 Distinct Pathways Generating Reactive Oxygen Species Mediate Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Induction by Advanced Glycation End Products. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1401–1407.
- Baynes, J. W.** (2002). The Maillard Hypothesis on Aging: Time to Focus on DNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **959**, 360–367.
- Bean, C. J., Boulet, S. L., Ellingsen, D., Pyle, M. E., Barron-Casella, E. A., Casella, J. F., Payne, A. B., Driggers, J., Trau, H. A., Yang, G., et al.** (2012). Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with reduced incidence of acute chest syndrome among children with sickle cell disease. *Blood* **120**, 3822–3828.
- Beckman, J. S. and Crow, J. P.** (1993). Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 330–334.
- Beckman, J. A., Creager, M. A. and Libby, P.** (2002). Diabetes and atherosclerosis: Epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* **287**, 2570–2581.
- Bedard, K. and Krause, K.-H.** (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245–313.
- Belcher, J. D., Nath, K. A. and Vercellotti, G. M.** (2013a). Vasculotoxic and Proinflammatory Effects of Plasma Heme: Cell Signaling and Cytoprotective Responses. *Int. Sch. Res. Not.* **2013**, e831596.
- Belcher, J. D., Young, M., Chen, C., Nguyen, J., Burhop, K., Tran, P. and Vercellotti, G. M.** (2013b). MP4CO, a pegylated hemoglobin saturated with carbon monoxide, is a modulator of HO-1, inflammation, and vaso-occlusion in transgenic sickle mice. *Blood* **122**, 2757–2764.
- Benesch, R. and Benesch, R. E.** (1967). The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **26**, 162–167.
- Bernstein, R. D., Ochoa, F. Y., Xu, X., Forfia, P., Shen, W., Thompson, C. I. and Hintze, T. H.** (1996). Function and Production of Nitric Oxide in the Coronary Circulation of the Conscious Dog During Exercise. *Circ. Res.* **79**, 840–848.

- Berry, P. A., Cross, T. J. S., Thein, S. L., Portmann, B. C., Wendon, J. A., Karani, J. B., Heneghan, M. A. and Bomford, A.** (2007). Hepatic Dysfunction in Sickle Cell Disease: A New System of Classification Based on Global Assessment. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 1469–1476.
- Bierhaus, A., Chevion, S., Chevion, M., Hofmann, M., Quehenberger, P., Illmer, T., Luther, T., Berentshtein, E., Tritschler, H., Müller, M., et al.** (1997). Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* **46**, 1481–1490.
- Bierhaus, A., Humpert, P. M., Morcos, M., Wendt, T., Chavakis, T., Arnold, B., Stern, D. M. and Nawroth, P. P.** (2005). Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J. Mol. Med.* **83**, 876–886.
- Bilé, A., Gallais, D. L., Mercier, J., Bogui, P. and Préfaut, C.** (1998). Sickle Cell Trait in Ivory Coast Athletic Throw and Jump Champions, 1956-1995. *Int. J. Sports Med.* **19**, 215–219.
- Bjørnstad, H. H., Bruvik, J., Bjørnstad, A. B., Hjeltestad, B. L., Damås, J. K. and Aukrust, P.** (2008). Exercise training decreases plasma levels of soluble CD40 ligand and P-selectin in patients with chronic heart failure. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil. Off. J. Eur. Soc. Cardiol. Work. Groups Epidemiol. Prev. Card. Rehabil. Exerc. Physiol.* **15**, 43–48.
- Blann, A. D., Mohan, J. S., Bareford, D. and Lip, G. Y. H.** (2008). Soluble P-selectin and vascular endothelial growth factor in steady state sickle cell disease: relationship to genotype. *J. Thromb. Thrombolysis* **25**, 185–189.
- Bloomer, R. J. and Goldfarb, A. H.** (2004). Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Can. J. Appl. Physiol. Rev. Can. Physiol. Appliquée* **29**, 245–263.
- Bloomer, R. J., Goldfarb, A. H., Wideman, L., McKenzie, M. J. and Consitt, L. A.** (2005). Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J. Strength Cond. Res. Natl. Strength Cond. Assoc.* **19**, 276–285.
- Bloomer, R. J., Goldfarb, A. H. and McKenzie, M. J.** (2006). Oxidative stress response to aerobic exercise: comparison of antioxidant supplements. *Med. Sci. Sports Exerc.* **38**, 1098–1105.
- Bogar, L., Juricskay, I., Kesmarky, G., Kenyeres, P. and Toth, K.** (2005). Erythrocyte transport efficacy of human blood: a rheological point of view. *Eur. J. Clin. Invest.* **35**, 687–690.
- Bonanomi, M. T. B. C. and Lavezzo, M. M.** (2013). Sickle cell retinopathy: diagnosis and treatment. *Arq. Bras. Oftalmol.* **76**, 320–327.
- Bookchin, R. M. and Lew, V. L.** (2002). Sickle red cell dehydration: mechanisms and interventions. *Curr. Opin. Hematol.* **9**, 107–110.
- Booth, C., Inusa, B. and Obaro, S. K.** (2010). Infection in sickle cell disease: A review. *Int. J. Infect. Dis.* **14**, e2–e12.
- Booth, F. W., Roberts, C. K. and Laye, M. J.** (2012). Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Compr. Physiol.* **2**, 1143–1211.
- Børsheim, E., Knardahl, S. and Høstmark, A. T.** (1999). Short-term effects of exercise on plasma very low density lipoproteins (VLDL) and fatty acids. *Med. Sci. Sports Exerc.* **31**, 522–530.

- Borsini, A., Zunszain, P. A., Thuret, S. and Pariante, C. M.** (2015). The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends Neurosci.* **38**, 145–157.
- Boulé, N. G., Kenny, G. P., Haddad, E., Wells, G. A. and Sigal, R. J.** (2003). Meta-analysis of the effect of structured exercise training on cardiorespiratory fitness in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* **46**, 1071–1081.
- Bowers, A. S., Pepple, D. J. and Reid, H. L.** (2008). Oxygen delivery index in subjects with normal haemoglobin (HbAA), sickle cell trait (HbAS) and homozygous sickle cell disease (HbSS). *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **40**, 303–309.
- Bowman, M. A. H. and Schmidt, A. M.** (2011). S100/calgranulins EN-RAGEing the blood vessels: implications for inflammatory responses and atherosclerosis. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* **1**, 92–100.
- Brett, J., Schmidt, A. M., Yan, S. D., Zou, Y. S., Weidman, E., Pinsky, D., Nowygrod, R., Neeper, M., Przysiecki, C., Shaw, A., et al.** (1993). Survey of the Distribution of a Newly Characterized Receptor for Advanced Glycation End Products in Tissues. *Am. J. Pathol.* **143**, 1699–1712.
- Brousse, V., Buffet, P. and Rees, D.** (2014). The spleen and sickle cell disease: the sick(led) spleen. *Br. J. Haematol.* **166**, 165–176.
- Brousse, V., Kossorotoff, M. and de Montalembert, M.** (2015). How I manage cerebral vasculopathy in children with sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* **170**, 615–625.
- Brun, J.-F.** (2002). Exercise hemorheology as a three acts play with metabolic actors: is it of clinical relevance? *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **26**, 155–174.
- Brun, J. F., Sekkat, M., Lagoueyte, C., Fedou, C. and Orsetti, A.** (1989). Relationships between fitness and blood viscosity in untrained normal short children. *Clin Hemorheol* **9**, 953–963.
- Brun, J. F., Bouchahda, C., Chaze, D., Benhaddad, A. A., Micallef, J. P. and Mercier, J.** (2000). The paradox of hematocrit in exercise physiology: which is the “normal” range from an hemorheologist’s viewpoint? *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **22**, 287–303.
- Bryan, H. K., Olayanju, A., Goldring, C. E. and Park, B. K.** (2013). The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 705–717.
- Bucala, R., Tracey, K. J. and Cerami, A.** (1991). Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J. Clin. Invest.* **87**, 432–438.
- Bucciarelli, L. G., Kaneko, M., Ananthakrishnan, R., Harja, E., Lee, L. K., Hwang, Y. C., Lerner, S., Bakr, S., Li, Q., Lu, Y., et al.** (2006). Receptor for Advanced-Glycation End Products Key Modulator of Myocardial Ischemic Injury. *Circulation* **113**, 1226–1234.
- Buczynski, A., Kedziora, J., Tkaczewski, W. and Wachowicz, B.** (1991). Effect of Submaximal Physical Exercise on Antioxidative Protection of Human Blood Platelets. *Int. J. Sports Med.* **12**, 52–54.
- Burnett, M. W., Md, J. W. B. and Cook, B. A.** (1998). Etiology of Osteomyelitis Complicating Sickle Cell Disease. *Pediatrics* **101**, 296–297.

Buttke, T. M. and Sandstrom, P. A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* **15**, 7–10.

C

Caboot, J. B., Jawad, A. F., McDonough, J. M., Bowdre, C. Y., Arens, R., Marcus, C. L., Mason, T. B. A., Smith-Whitley, K., Ohene-Frempong, K. and Allen, J. L. (2012). Non-Invasive Measurements of Carboxyhemoglobin and Methemoglobin in Children with Sickle Cell Disease. *Pediatr. Pulmonol.* **47**, 808–815.

Callahan, L. A., Woods, K. F., Mensah, G. A., Ramsey, L. T., Barbeau, P. and Gutin, B. (2002). Cardiopulmonary Responses to Exercise in Women with Sickle Cell Anemia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 1309–1316.

Camhi, S. M., Stefanick, M. L., Ridker, P. M. and Young, D. R. (2010). Changes in C-reactive protein from low-fat diet and/or physical activity in men and women with and without metabolic syndrome. *Metabolism* **59**, 54–61.

Campbell, K. L., Campbell, P. T., Ulrich, C. M., Wener, M., Alfano, C. M., Foster-Schubert, K., Rudolph, R. E., Potter, J. D. and McTiernan, A. (2008). No Reduction in C-Reactive Protein following a 12-Month Randomized Controlled Trial of Exercise in Men and Women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **17**, 1714–1718.

Carocho, M. and Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **51**, 15–25.

Caspersen, C. J., Powell, K. E. and Christenson, G. M. (1985). Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep.* **100**, 126–131.

Cazenave, M., Koehl, B., Nochy, D., Tharaux, P.-L. and Audard, V. (2014). Atteintes rénales au cours de la drépanocytose. *Néphrologie Thérapeutique* **10**, 10–16.

Chakravarthy, U., Hayes, R. G., Stitt, A. W., McAuley, E. and Archer, D. B. (1998). Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycation end products. *Diabetes* **47**, 945–952.

Chantrathamchart, P., Mackman, N., Sparkenbaugh, E., Wang, J.-G., Parise, L. V., Kirchhofer, D., Key, N. S. and Pawlinski, R. (2012). Tissue factor promotes activation of coagulation and inflammation in a mouse model of sickle cell disease. *Blood* **120**, 636–646.

Charache, S., Terrin, M. L., Moore, R. D., Dover, G. J., Barton, F. B., Eckert, S. V., McMahon, R. P. and Bonds, D. R. (1995). Effect of Hydroxyurea on the Frequency of Painful Crises in Sickle Cell Anemia. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1317–1322.

Chartoumpakis, D. V., Ziros, P. G., Zaravinos, A., Iskrenova, R. P., Psyrogiannis, A. I., Kyriazopoulou, V. E., Sykiotis, G. P., Habeos, I. G., Chartoumpakis, D. V., Ziros, P. G., et al. (2013). Hepatic Gene Expression Profiling in Nrf2 Knockout Mice after Long-Term High-Fat Diet-Induced Obesity, Hepatic Gene Expression Profiling in Nrf2 Knockout Mice after Long-Term High-Fat Diet-Induced Obesity. *Oxidative Med. Cell. Longev. Oxidative Med. Cell. Longev.* **2013**, 2013, e340731.

- Chaudière, J. and Ferrari-Iliou, R.** (1999). Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* **37**, 949–962.
- Chavakis, T., Bierhaus, A., Al-Fakhri, N., Schneider, D., Witte, S., Linn, T., Nagashima, M., Morser, J., Arnold, B., Preissner, K. T., et al.** (2003). The Pattern Recognition Receptor (RAGE) Is a Counterreceptor for Leukocyte Integrins. *J. Exp. Med.* **198**, 1507–1515.
- Chavakis, T., Bierhaus, A. and Nawroth, P. P.** (2004). RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes Infect.* **6**, 1219–1225.
- Chirico, E. N. and Pialoux, V.** (2012). Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life* **64**, 72–80.
- Chirico, E. N., Martin, C., Faës, C., Féasson, L., Oyono-Enguélé, S., Aufradet, E., Dubouchaud, H., Francina, A., Canet-Soulas, E., Thiriet, P., et al.** (2012). Exercise training blunts oxidative stress in sickle cell trait carriers. *J. Appl. Physiol.* **112**, 1445–1453.
- Chiu-Braga, Y. Y., Hayashi, S. Y., Schafranski, M. and Messias-Reason, I. J. T.** (2006). Further evidence of inflammation in chronic rheumatic valve disease (CRVD): High levels of advanced oxidation protein products (AOPP) and high sensitive C-reactive protein (hs-CRP). *Int. J. Cardiol.* **109**, 275–276.
- Church, T. S., Barlow, C. E., Earnest, C. P., Kampert, J. B., Priest, E. L. and Blair, S. N.** (2002). Associations Between Cardiorespiratory Fitness and C-Reactive Protein in Men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 1869–1876.
- Clarkson, P. M. and Thompson, H. S.** (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 637s–646s.
- Connes, P.** (2015). Sickle cell trait, exertional rhabdomyolysis, and compartment syndrome. *The Lancet* **385**, 1948.
- Connes, P., Sara, F., Hardy-Dessources, M.-D., Marlin, L., Etienne, F., Larifla, L., Saint-Martin, C. and Hue, O.** (2006). Effects of short supramaximal exercise on hemorheology in sickle cell trait carriers. *Eur. J. Appl. Physiol.* **97**, 143–150.
- Connes, P., Hardy-Dessources, M.-D. and Hue, O.** (2007). Counterpoint: Sickle cell trait should not be considered asymptomatic and as a benign condition during physical activity. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **103**, 2138-2140-2141.
- Connes, P., Reid, H., Hardy-Dessources, M.-D., Morrison, E. and Hue, O.** (2008). Physiological responses of sickle cell trait carriers during exercise. *Sports Med. Auckl. NZ* **38**, 931–946.
- Connes, P., Machado, R., Hue, O. and Reid, H.** (2011). Exercise limitation, exercise testing and exercise recommendations in sickle cell anemia. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **49**, 151–163.
- Connes, P., Verlhac, S. and Bernaudin, F.** (2013a). Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. *Br. J. Haematol.* **161**, 484–498.
- Connes, P., Lamarre, Y., Hardy-Dessources, M.-D., Lemonne, N., Waltz, X., Mougénel, D., Mukisi-Mukaza, M., Lalanne-Mistrih, M.-L., Tarer, V., Tressières, B., et al.** (2013b). Decreased Hematocrit-To-Viscosity Ratio and Increased Lactate Dehydrogenase Level in Patients with Sickle Cell Anemia and Recurrent Leg Ulcers. *PLoS ONE* **8**, e79680.

- Conran, N., Fattori, A., Saad, S. T. O. and Costa, F. F.** (2004). Increased levels of soluble ICAM-1 in the plasma of sickle cell patients are reversed by hydroxyurea. *Am. J. Hematol.* **76**, 343–347.
- Convertino, V. A.** (1991). Blood volume: its adaptation to endurance training. *Med. Sci. Sports Exerc.* **23**, 1338–1348.
- Coughlan, M. T., Thorburn, D. R., Penfold, S. A., Laskowski, A., Harcourt, B. E., Sourris, K. C., Tan, A. L. Y., Fukami, K., Thallas-Bonke, V., Nawroth, P. P., et al.** (2009). RAGE-Induced Cytosolic ROS Promote Mitochondrial Superoxide Generation in Diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **20**, 742–752.
- Covas, M.-I., Elosua, R., Fitó, M., Alcántara, M., Coca, L. and Marrugat, J.** (2002). Relationship between physical activity and oxidative stress biomarkers in women. *Med. Sci. Sports Exerc.* **34**, 814–819.
- Criswell, D., Powers, S., Dodd, S., Lawler, J., Edwards, W., Renshler, K. and Grinton, S.** (1993). High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med. Sci. Sports Exerc.* **25**, 1135–1140.
- Crosby, W. H.** (1955). The metabolism of hemoglobin and bile pigment in hemolytic disease. *Am. J. Med.* **18**, 112–122.
- Cruz, P. R. S., Lira, R. P. C., Pereira Filho, S. A. C., Souza, B. B., Mitsuushi, F. N., Menea, F., Fertrin, K. Y., Vasconcellos, J. P. C., Conran, N., Costa, F. F., et al.** (2015). Increased circulating PEDF and low sICAM-1 are associated with sickle cell retinopathy. *Blood Cells. Mol. Dis.* **54**, 33–37.

D

- Dalle, J.-H.** (2013). Hematopoietic stem cell transplantation in SCD. *C. R. Biol.* **336**, 148–151.
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R. and Milzani, A.** (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.* **9**, 169–176.
- Damanhour, G. A., Jarullah, J., Marouf, S., Hindawi, S. I., Mushtaq, G. and Kamal, M. A.** (2015). Clinical biomarkers in sickle cell disease. *Saudi J. Biol. Sci.* **22**, 24–31.
- Darbari, D. S., Nouraie, M., Taylor, J. G., Brugnara, C., Castro, O. and Ballas, S. K.** (2014). Alpha-thalassaemia and response to hydroxyurea in sickle cell anaemia. *Eur. J. Haematol.* **92**, 341–345.
- Das, S. K. and Nair, R. C.** (1980). Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, Catalase and Lipid Peroxidation of Normal and Sickled Erythrocytes. *Br. J. Haematol.* **44**, 87–92.
- Das, S. K., Hinds, J. E., Hardy, R. E., Collins, J. C. and Mukherjee, S.** (1993). Effects of physical stress on peroxide scavengers in normal and sickle cell trait erythrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 139–147.
- De Franceschi, L., Baron, A., Scarpa, A., Adrie, C., Janin, A., Barbi, S., Kister, J., Rouyer-Fessard, P., Corrocher, R., Leboulch, P., et al.** (2003). Inhaled nitric oxide protects transgenic SAD mice from sickle cell disease-specific lung injury induced by hypoxia/reoxygenation. *Blood* **102**, 1087–1096.

- De Paepe, M. E. and Trudel, M.** (1994). The transgenic SAD mouse: a model of human sickle cell glomerulopathy. *Kidney Int.* **46**, 1337–1345.
- Deisseroth, A., Nienhuis, A., Lawrence, J., Giles, R., Turner, P. and Ruddle, F. H.** (1978). Chromosomal Localization of Human β Globin Gene on Human Chromosome 11 in Somatic Cell Hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 1456–1460.
- Delclaux, C., Zerah-Lancner, F., Bachir, D., Habibi, A., Monin, J.-L., Godeau, B. and Galacteros, F.** (2005). Factors Associated With Dyspnea in Adult Patients With Sickle Cell Disease. *Chest* **128**, 3336–3344.
- Delp, M. D. and Laughlin, M. H.** (1997). Time course of enhanced endothelium-mediated dilation in aorta of trained rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* **29**, 1454–1461.
- Demerath, E., Towne, B., Blangero, J. and Siervogel, R. M.** (2001). The relationship of soluble ICAM-1, VCAM-1, P-selectin and E-selectin to cardiovascular disease risk factors in healthy men and women. *Ann. Hum. Biol.* **28**, 664–678.
- Desai, P. C. and Ataga, K. I.** (2013). The acute chest syndrome of sickle cell disease. *Expert Opin. Pharmacother.* **14**, 991–999.
- Descamps-Latscha, B., Witko-Sarsat, V., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Gausson, V., Mothu, N., London, G. M. and Jungers, P.** (2005). Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* **45**, 39–47.
- Detterich, J., Alexy, T., Rabai, M., Wenby, R., Dongelyan, A., Coates, T., Wood, J. and Meiselman, H.** (2013). Low-shear red blood cell oxygen transport effectiveness is adversely affected by transfusion and further worsened by deoxygenation in sickle cell disease patients on chronic transfusion therapy. *Transfusion (Paris)* **53**, 297–305.
- Dhaliwal, G., Cornett, P. A. and Tierney, L. M.** (2004). Hemolytic anemia. *Am. Fam. Physician* **69**, 2599–2606.
- Dhalla, N. S., Temsah, R. M. and Netticadan, T.** (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens.* **18**, 655–673.
- Dhar, M., Bellevue, R., Brar, S. and Carmel, R.** (2004). Mild hyperhomocysteinemia in adult patients with sickle cell disease: A common finding unrelated to folate and cobalamin status. *Am. J. Hematol.* **76**, 114–120.
- Di Francescomarino, S., Sciartilli, A., Di Valerio, V., Di Baldassarre, A. and Gallina, S.** (2009). The effect of physical exercise on endothelial function. *Sports Med. Auckl. NZ* **39**, 797–812.
- Di Massimo, C., Scarpelli, P. and Tozzi-Ciancarelli, M. G.** (2004). Possible involvement of oxidative stress in exercise-mediated platelet activation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **30**, 313–316.
- Diaw, M., Pialoux, V., Martin, C., Samb, A., Diop, S., Faes, C., Mury, P., Diop, N. S., Diop, S.-N., Ranque, B., et al.** (2015a). Sickle Cell Trait Worsens Oxidative Stress, Abnormal Blood Rheology, and Vascular Dysfunction in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **38**, 2120–2127.

- Diaw, M., Diop, S., Soubaiga, F. Y. W., Seck, M., Faye, B. F., Niang, M. N., Samb, A. and Connes, P.** (2015b). Blood viscosity is lower in trained than in sedentary sickle cell trait carriers. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **61**, 23–29.
- Dinarello, C. A.** (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest* **118**, 503–508.
- Dinkova-Kostova, A. T. and Talalay, P.** (2010). NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch. Biochem. Biophys.* **501**, 116–123.
- Djordjevic, D., Cubrilo, D., Macura, M., Barudzic, N., Djuric, D. and Jakovljevic, V.** (2011). The influence of training status on oxidative stress in young male handball players. *Mol. Cell. Biochem.* **351**, 251–259.
- Drenth, J. P., Uum, S. H. V., Deuren, M. V., Pesman, G. J., Ven-Jongekrijg, J. V. der and Meer, J. W. V. der** (1995). Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production. *J. Appl. Physiol.* **79**, 1497–1503.
- Duits, A. J., Pieters, R. C., Saleh, A. W., van Rosmalen, E., Katerberg, H., Berend, K. and Rojer, R. A.** (1996). Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **81**, 96–98.
- Duits, A. J., Schnog, J. B., Lard, L. R., Saleh, A. w. and Rojer, R. A.** (1998). Elevated IL-8 levels during sickle cell crisis. *Eur. J. Haematol.* **61**, 302–305.
- Duracková, Z.** (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* **59**, 459–469.
- Durante, W., Kroll, M. H., Christodoulides, N., Peyton, K. J. and Schafer, A. I.** (1997). Nitric Oxide Induces Heme Oxygenase-1 Gene Expression and Carbon Monoxide Production in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* **80**, 557–564.
- Dziedzic, T.** (2015). Systemic inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke. *Expert Rev. Neurother.* **15**, 523–531.
- E**
- Eaton, W. A. and Hofrichter, J.** (1990). Sickle Cell Hemoglobin Polymerization. In *Advances in Protein Chemistry* (ed. C.B. Anfinsen, J. T. E., Frederic M. Richards and David S. Eisenberg), pp. 63–279. Academic Press.
- Ebert, E. C., Nagar, M. and Hagspiel, K. D.** (2010). Gastrointestinal and Hepatic Complications of Sickle Cell Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **8**, 483–489.
- Eichner, E. R.** (2010). Sickle cell trait in sports. *Curr. Sports Med. Rep.* **9**, 347–351.
- Elahi, M. M., Kong, Y. X. and Matata, B. M.** (2009). Oxidative Stress as a Mediator of Cardiovascular Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2**, 259–269.
- El-Ghamrawy, M. K., Hanna, W. M., Abdel-Salam, A., El-Sonbaty, M. M., Youness, E. R. and Adel, A.** (2014). Oxidant-antioxidant status in Egyptian children with sickle cell anemia: a single center based study. *J. Pediatr. (Rio J.)* **90**, 286–292.

- Elmariah, H., Garrett, M. E., De Castro, L. M., Jonassaint, J. C., Ataga, K. I., Eckman, J. R., Ashley-Koch, A. E. and Telen, M. J.** (2014). Factors associated with survival in a contemporary adult sickle cell disease cohort. *Am. J. Hematol.* **89**, 530–535.
- Elosua, R., Molina, L., Fito, M., Arquer, A., Sanchez-Quesada, J. L., Covas, M. I., Ordoñez-Llanos, J. and Marrugat, J.** (2003). Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis* **167**, 327–334.
- Emmel, V. E.** (1917). Study of the erythrocytes in a case of severe anemia with elongated and sickle-shaped red blood corpuscles. *Arch Intern Med Chic* **XX**, 586.
- Ernst, E.** (1987). Influence of regular physical activity on blood rheology. *Eur. Heart J.* **8**, 59–62.
- Escamilla-Tilch, M., Filio-Rodríguez, G., García-Rocha, R., Mancilla-Herrera, I., Mitchison, N. A., Ruiz-Pacheco, J. A., Sánchez-García, F. J., Sandoval-Borrego, D. and Vázquez-Sánchez, E. A.** (2013). The interplay between pathogen-associated and danger-associated molecular patterns: an inflammatory code in cancer? *Immunol. Cell Biol.* **91**, 601–610.
- Etienne-Julan, M., Belloy, M. S., Decastel, M., Dougaparsad, S., Ravion, S. and Hardy-Dessources, M. D.** (2004). Childhood sickle cell crises: clinical severity, inflammatory markers and the role of interleukin-8. *Haematologica* **89**, 863–864.

F

- Fabry, M. E., Nagel, R. L., Pachnis, A., Suzuka, S. M. and Costantini, F.** (1992). 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**, 12150–12154.
- Faes, C., Martin, C., Chirico, E. N., Féasson, L., Oyonno-Enguelle, S., Dubouchaud, H., Francina, A., Thiriet, P., Pialoux, V. and Messonnier, L.** (2012). Effect of α -thalassaemia on exercise-induced oxidative stress in sickle cell trait. *Acta Physiol.* **205**, 541–550.
- Faes, C., Balayssac-Siransy, E., Connes, P., Hivert, L., Danho, C., Bogui, P., Martin, C. and Pialoux, V.** (2014). Moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia: effects on oxidative stress and endothelial activation. *Br. J. Haematol.* **164**, 124–130.
- Faes, C., Charrin, E., Connes, P., Pialoux, V. and Martin, C.** (2015). Chronic physical activity limits blood rheology alterations in transgenic SAD mice. *Am. J. Hematol.* **90**, E32–E33.
- Falone, S., Mirabilio, A., Pennelli, A., Cacchio, M., Di Baldassarre, A., Gallina, S., Passerini, A. and Amicarelli, F.** (2010). Differential impact of acute bout of exercise on redox- and oxidative damage-related profiles between untrained subjects and amateur runners. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* **59**, 953–961.
- Farmer, D. G. S. and Kennedy, S.** (2009). RAGE, vascular tone and vascular disease. *Pharmacol. Ther.* **124**, 185–194.
- Fasola, F., Adedapo, K., Anetor, J. and Kuti, M.** (2007). Total antioxidants status and some hematological values in sickle cell disease patients in steady state. *J. Natl. Med. Assoc.* **99**, 891–894.

- Faës, C., Martin, C., Chirico, E. N., Féasson, L., Oyonno-Enguelle, S., Dubouchaud, H., Francina, A., Thiriet, P., Pialoux, V. and Messonnier, L.** (2012). Effect of α -thalassaemia on exercise-induced oxidative stress in sickle cell trait. *Acta Physiol.* **205**, 541–550.
- Febbraio, M. A. and Pedersen, B. K.** (2002). Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J.* **16**, 1335–1347.
- Feghali, C. A. and Wright, T. M.** (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **2**, d12-26.
- Fellmann, N.** (1992). Hormonal and plasma volume alterations following endurance exercise. A brief review. *Sports Med. Auckl. NZ* **13**, 37–49.
- Fellmann, N., Bedu, M., Giry, J., Pharmakis-Amadiou, M., Bezou, M. J., Barlet, J. P. and Coudert, J.** (1989). Hormonal, fluid, and electrolyte changes during a 72-h recovery from a 24-h endurance run. *Int. J. Sports Med.* **10**, 406–412.
- Fischer, C. P.** (2006). Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc. Immunol. Rev.* **12**, 6–33.
- Fisher-Wellman, K. and Bloomer, R. J.** (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn. Med. DM* **8**, 1.
- Fleming, I. and Busse, R.** (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **284**, R1–R12.
- Florey** (1966). The endothelial cell. *Br. Med. J.* **2**, 487–490.
- Ford, E. S.** (2002). Does exercise reduce inflammation? Physical activity and C-reactive protein among U.S. adults. *Epidemiol. Camb. Mass* **13**, 561–568.
- Francis, R. B. and Haywood, L. J.** (1992). Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. *J. Natl. Med. Assoc.* **84**, 611–615.
- Franck, P. F., Bevers, E. M., Lubin, B. H., Comfurius, P., Chiu, D. T., Op den Kamp, J. A., Zwaal, R. F., van Deenen, L. L. and Roelofsen, B.** (1985). Uncoupling of the membrane skeleton from the lipid bilayer. The cause of accelerated phospholipid flip-flop leading to an enhanced procoagulant activity of sickled cells. *J. Clin. Invest.* **75**, 183–190.
- Frenette, P. S.** (2002). Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Curr. Opin. Hematol.* **9**, 101–106.
- Freund, B. J., Claybaugh, J. R., Dice, M. S. and Hashiro, G. M.** (1987). Hormonal and vascular fluid responses to maximal exercise in trained and untrained males. *J. Appl. Physiol.* **63**, 669–675.
- Friedman, M. J., Roth, E. F., Nagel, R. L. and Trager, W.** (1979). Plasmodium falciparum: Physiological interactions with the human sickle cell. *Exp. Parasitol.* **47**, 73–80.
- Frommhold, D., Kamphues, A., Hepper, I., Pruenster, M., Lukić, I. K., Socher, I., Zablotskaya, V., Buschmann, K., Lange-Sperandio, B., Schymeinsky, J., et al.** (2010). RAGE and ICAM-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo. *Blood* **116**, 841–849.

Fry, R. W., Morton, A. R., Crawford, G. P. and Keast, D. (1992). Cell numbers and in vitro responses of leucocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. *Eur. J. Appl. Physiol.* **64**, 218–227.

Frydelund-Larsen, L., Penkowa, M., Akerstrom, T., Zankari, A., Nielsen, S. and Pedersen, B. K. (2007). Exercise induces interleukin-8 receptor (CXCR2) expression in human skeletal muscle. *Exp. Physiol.* **92**, 233–240.

G

Gabriel, A. and Przybylski, J. (2010). Sickle-Cell Anemia: A Look at Global Haplotype Distribution. [Httpwwwnaturecomscitabletopicpagesickle-Cell-Anemia--Look--Glob.-8756219](http://www.nature.com/scitable/topicpages/sickle-Cell-Anemia--Look--Glob.-8756219).

Gaeini, A. A., Rahnama, N. and Hamedinia, M. R. (2006). Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress at rest and after exercise to exhaustion in athletic students. *J. Sports Med. Phys. Fitness* **46**, 458–461.

Galié, N., Manes, A. and Branzi, A. (2004). The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc. Res.* **61**, 227–237.

Gardner, K., Suddle, A., Kane, P., O’Grady, J., Heaton, N., Bomford, A. and Thein, S. L. (2014). How we treat sickle hepatopathy and liver transplantation in adults. *Blood* **123**, 2302–2307.

Gee, B. E. and Platt, O. S. (1995). Sickle reticulocytes adhere to VCAM-1. *Blood* **85**, 268–274.

Gemmete, J. J., Davagnanam, I., Toma, A. K., Brew, S. and Ganesan, V. (2013). Arterial ischemic stroke in children. *Neuroimaging Clin. N. Am.* **23**, 781–798.

George, L., Lokhandwala, M. F. and Asghar, M. (2009). Exercise activates redox-sensitive transcription factors and restores renal D1 receptor function in old rats. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **297**, F1174–F1180.

Ghosh, S., Tan, F. and Ofori-Acquah, S. F. (2012). Spatiotemporal Dysfunction of the Vascular Permeability Barrier in Transgenic Mice with Sickle Cell Disease. *Anemia* **2012**, e582018.

Ghosh, S., Adisa, O. A., Chappa, P., Tan, F., Jackson, K. A., Archer, D. R. and Ofori-Acquah, S. F. (2013). Extracellular hemin crisis triggers acute chest syndrome in sickle mice. *J. Clin. Invest.* **123**, 4809–4820.

Gillen, C. M., Lee, R., Mack, G. W., Tomaselli, C. M., Nishiyasu, T. and Nadel, E. R. (1991). Plasma volume expansion in humans after a single intense exercise protocol. *J. Appl. Physiol.* **71**, 1914–1920.

Gima, A. S. and Bemis, E. L. (1975). Absence of major illnesses in sickle cell trait: Results from a controlled study. *J. Natl. Med. Assoc.* **67**, 216–219.

Gkogkolou, P. and Böhm, M. (2012). Advanced glycation end products. *Dermatoendocrinol.* **4**, 259–270.

Gladwin, M. T. and Ofori-Acquah, S. F. (2014). Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. *Blood* **123**, 3689–3690.

- Gladwin, M. T. and Sachdev, V.** (2012). Cardiovascular Abnormalities in Sickle Cell Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **59**, 1123–1133.
- Gladwin, M. T. and Vichinsky, E.** (2008). Pulmonary Complications of Sickle Cell Disease. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2254–2265.
- Gladwin, M. T., Sachdev, V., Jison, M. L., Shizukuda, Y., Plehn, J. F., Minter, K., Brown, B., Coles, W. A., Nichols, J. S., Ernst, I., et al.** (2004). Pulmonary Hypertension as a Risk Factor for Death in Patients with Sickle Cell Disease. *N. Engl. J. Med.* **350**, 886–895.
- Gleeson, M.** (2007). Immune function in sport and exercise. *J. Appl. Physiol.* **103**, 693–699.
- Godwin, M. J., Embury, S. H. and Claster, S.** (1981). Risk of Altitude Exposure in Sickle Cell Disease. *West. J. Med.* **135**, 364–367.
- Golbidi, S., Badran, M. and Laher, I.** (2012). Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Exercise in Diabetic Patients. *Exp. Diabetes Res.* **2012**,.
- Goldfarb, A. H., Patrick, S. W., Bryer, S. and You, T.** (2005). Vitamin C supplementation affects oxidative-stress blood markers in response to a 30-minute run at 75% VO₂max. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **15**, 279–290.
- Goldfarb, A. H., McKenzie, M. J. and Bloomer, R. J.** (2007). Gender comparisons of exercise-induced oxidative stress: influence of antioxidant supplementation. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **32**, 1124–1131.
- Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. M. and Creager, M. A.** (2006). Advanced Glycation End Products Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation* **114**, 597–605.
- Gomez-Cabrera, M.-C., Borrás, C., Pallardó, F. V., Sastre, J., Ji, L. L. and Viña, J.** (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J. Physiol.* **567**, 113–120.
- Gomez-Cabrera, M.-C., Domenech, E. and Viña, J.** (2008). Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 126–131.
- Gonçalves, M. S., Queiroz, I. L., Cardoso, S. A., Zanetti, A., Strapazoni, A. C., Adorno, E., Albuquerque, A., Sant’Ana, A., Reis, M. G. dos, Barral, A., et al.** (2001). Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34**, 1309–1313.
- Goodman, C., Rogers, G. G., Vermaak, H. and Goodman, M. R.** (1985). Biochemical responses during recovery from maximal and submaximal swimming exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **54**, 436–441.
- Gordeuk, V. R., Minniti, C. P., Nouraie, M., Campbell, A. D., Rana, S. R., Luchtman-Jones, L., Sable, C., Dham, N., Ensing, G., Prchal, J. T., et al.** (2011). Elevated tricuspid regurgitation velocity and decline in exercise capacity over 22 months of follow up in children and adolescents with sickle cell anemia. *Haematologica* **96**, 33–40.
- Goto, C., Nishioka, K., Umemura, T., Jitsuiki, D., Sakagutchi, A., Kawamura, M., Chayama, K., Yoshizumi, M. and Higashi, Y.** (2007). Acute Moderate-Intensity Exercise Induces

- Vasodilation Through an Increase in Nitric Oxide Bioavailability in Humans. *Am. J. Hypertens.* **20**, 825–830.
- Gougoura, S., Nikolaidis, M. G., Kostaropoulos, I. A., Jamurtas, A. Z., Koukoulis, G. and Kouretas, D.** (2007). Increased oxidative stress indices in the blood of child swimmers. *Eur. J. Appl. Physiol.* **100**, 235–239.
- Graido-Gonzalez, E., Doherty, J. C., Bergreen, E. W., Organ, G., Telfer, M. and McMillen, M. A.** (1998). Plasma Endothelin-1, Cytokine, and Prostaglandin E2 Levels in Sickle Cell Disease and Acute Vaso-Occlusive Sickle Crisis. *Blood* **92**, 2551–2555.
- Granger, D. N. and Senchenkova, E.** (2010). Leukocyte–Endothelial Cell Adhesion.
- Green, H. J., Sutton, J. R., Coates, G., Ali, M. and Jones, S.** (1991). Response of red cell and plasma volume to prolonged training in humans. *J. Appl. Physiol.* **70**, 1810–1815.
- Green, D. J., Maiorana, A., O’Driscoll, G. and Taylor, R.** (2004). Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J. Physiol.* **561**, 1–25.
- Green, D. J., Bilsborough, W., Naylor, L. H., Reed, C., Wright, J., O’Driscoll, G. and Walsh, J. H.** (2005). Comparison of forearm blood flow responses to incremental handgrip and cycle ergometer exercise: relative contribution of nitric oxide. *J. Physiol.* **562**, 617–628.
- Guh, J.-H., Hwang, T.-L., Ko, F.-N., Chueh, S.-C., Lai, M.-K. and Teng, C.-M.** (1998). Antiproliferative Effect in Human Prostatic Smooth Muscle Cells by Nitric Oxide Donor. *Mol. Pharmacol.* **53**, 467–474.
- Gutierrez, H. H., Nieves, B., Chumley, P., Rivera, A. and Freeman, B. A.** (1996). Nitric oxide regulation of superoxide-dependent lung injury: Oxidant-protective actions of endogenously produced and exogenously administered nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* **21**, 43–52.
- Gutteridge, J. M. C. and Halliwell, B.** (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 129–135.
- ## H
- Haldane, J. B. S.** (1949). The Rate of Mutation of Human Genes. *Hereditas* **35**, 267–273.
- Hallal, P. C., Andersen, L. B., Bull, F. C., Guthold, R., Haskell, W. and Ekelund, U.** (2012). Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. *The Lancet* **380**, 247–257.
- Halliwell, B.** (2000). Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 1082–1087.
- Halliwell, B.** (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1147–1150.
- Halphen, I., Elie, C., Brousse, V., Le Bourgeois, M., Allali, S., Bonnet, D. and de Montalembert, M.** (2014). Severe Nocturnal and Postexercise Hypoxia in Children and Adolescents with Sickle Cell Disease. *PLoS ONE* **9**,.
- Hambrecht, R., Adams, V., Erbs, S., Linke, A., Kränkel, N., Shu, Y., Baither, Y., Gielen, S., Thiele, H., Gummert, J. F., et al.** (2003). Regular Physical Activity Improves Endothelial Function in

- Patients With Coronary Artery Disease by Increasing Phosphorylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation* **107**, 3152–3158.
- Hamer, M., Sabia, S., Batty, G. D., Shipley, M. J., Tabàk, A. G., Singh-Manoux, A. and Kivimaki, M.** (2012). Physical Activity and Inflammatory Markers Over 10 Years: Follow-Up in Men and Women from the Whitehall II Cohort Study. *Circulation* CIRCULATIONAHA.112.103879.
- Hamideh, D. and Alvarez, O.** (2013). Sickle cell disease related mortality in the United States (1999–2009). *Pediatr. Blood Cancer* **60**, 1482–1486.
- Hanada, T. and Yoshimura, A.** (2002). Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 413–421.
- Harris, K. M., Haas, T. S., Eichner, E. R. and Maron, B. J.** (2012). Sickle Cell Trait Associated With Sudden Death in Competitive Athletes. *Am. J. Cardiol.* **110**, 1185–1188.
- Harrison, M. H.** (1985). Effects on thermal stress and exercise on blood volume in humans. *Physiol. Rev.* **65**, 149–209.
- Hartog, J. W. L., Voors, A. A., Bakker, S. J. L., Smit, A. J. and van Veldhuisen, D. J.** (2007). Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications. *Eur. J. Heart Fail.* **9**, 1146–1155.
- Hasanato, R. M. W.** (2006). Zinc and antioxidant vitamin deficiency in patients with severe sickle cell anemia. *Ann. Saudi Med.* **26**, 17–21.
- Hatzipantelis, E. S., Pana, Z. D., Gombakis, N., Taparkou, A., Tzimouli, V., Kleta, D., Zafeiriou, D. J., Garipidou, V., Kanakoudi, F. and Athanassiou, M.** (2013). Endothelial activation and inflammation biomarkers in children and adolescents with sickle cell disease. *Int. J. Hematol.* **98**, 158–163.
- Haupt, H. M., Moore, G. W., Bauer, T. W. and Hutchins, G. M.** (1982). The lung in sickle cell disease. *Chest* **81**, 332–337.
- Hebbel, R. P.** (2011). Reconstructing sickle cell disease: A data-based analysis of the “hyperhemolysis paradigm” for pulmonary hypertension from the perspective of evidence-based medicine. *Am. J. Hematol.* **86**, 123–154.
- Hebbel, R. P.** (2014). Ischemia-reperfusion injury in sickle cell anemia: relationship to acute chest syndrome, endothelial dysfunction, arterial vasculopathy, and inflammatory pain. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **28**, 181–198.
- Hebbel, R. P., Yamada, O., Moldow, C. F., Jacob, H. S., White, J. G. and Eaton, J. W.** (1980a). Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium: possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease. *J. Clin. Invest.* **65**, 154–160.
- Hebbel, R. P., Boogaerts, M. A. B., Eaton, J. W. and Steinberg, M. H.** (1980b). Erythrocyte Adherence to Endothelium in Sickle-Cell Anemia. *N. Engl. J. Med.* **302**, 992–995.
- Hebbel, R. P., Eaton, J. W., Balasingam, M. and Steinberg, M. H.** (1982). Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J. Clin. Invest.* **70**, 1253–1259.

- Hebbel, R. P., Morgan, W. T., Eaton, J. W. and Hedlund, B. E.** (1988). Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 237–241.
- Hebbel, R. P., Osarogiagbon, R. and Kaul, D.** (2004). The Endothelial Biology of Sickle Cell Disease: Inflammation and a Chronic Vasculopathy. *Microcirculation* **11**, 129–151.
- Hedo, C. C., Aken’ova, Y. A., Okpala, I. E., Durojaiye, A. O. and Salimonu, L. S.** (1993). Acute phase reactants and severity of homozygous sickle cell disease. *J. Intern. Med.* **233**, 467–470.
- Hegab, Z., Gibbons, S., Neyses, L. and Mamas, M. A.** (2012). Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. *World J. Cardiol.* **4**, 90–102.
- Henle, E. S., Luo, Y., Gassmann, W. and Linn, S.** (1996). Oxidative Damage to DNA Constituents by Iron-mediated Fenton Reactions THE DEOXYGUANOSINE FAMILY. *J. Biol. Chem.* **271**, 21177–21186.
- Herrick, J. B.** (2001). Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. *Yale J. Biol. Med.* **74**, 179–184.
- 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., et al.** (2005). Proinflammatory cytokines and the hypermetabolism of children with sickle cell disease. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **230**, 68–74.
- Higuchi, M., Cartier, L. J., Chen, M. and Holloszy, J. O.** (1985). Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. *J. Gerontol.* **40**, 281–286.
- Hill, J. O. and Peters, J. C.** (1998). Environmental Contributions to the Obesity Epidemic. *Science* **280**, 1371–1374.
- Hjelstuen, A., Anderssen, S. A., Holme, I., Seljeflot, I. and Klemsdal, T. O.** (2006). Markers of Inflammation Are Inversely Related to Physical Activity and Fitness in Sedentary Men With Treated Hypertension. *Am. J. Hypertens.* **19**, 669–675.
- Hoepfer, M. M., Niedermeyer, J., Hoffmeyer, F., Flemming, P. and Fabel, H.** (1999). Pulmonary Hypertension after Splenectomy? *Ann. Intern. Med.* **130**, 506–509.
- Holtzclaw, J. D., Jack, D., Aguayo, S. M., Eckman, J. R., Roman, J. and Hsu, L. L.** (2004). Enhanced Pulmonary and Systemic Response to Endotoxin in Transgenic Sickle Mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 687–695.
- Hoppe, C. C.** (2014). Inflammatory Mediators of Endothelial Injury in Sickle Cell Disease. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **28**, 265–286.
- Horton, E. S. and Beisel, W. R.** (1994). Chapter 11 - The Metabolic Responses to Stress and Physical Activity. In *Food components to enhance performance*, pp. 209–220. Bernadette M. Marriott.
- Hostyn, S. V., Carvalho, W. B. de, Johnston, C. and Braga, J. A. P.** (2013). Evaluation of functional capacity for exercise in children and adolescents with sickle-cell disease through the six-minute walk test. *J. Pediatr. (Rio J.)* **89**, 588–594.
- Hotamisligil, G. S.** (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860–867.

- Howard, J., Thein, S. L., Galacteros, F., Inati, A., Reid, M., Keipert, P. E., Small, T. N. and Booth, F.** (2013). Safety and Tolerability Of MP4CO: A Dose Escalation Study In Stable Patients With Sickle Cell Disease. *Blood* **122**, 2205–2205.
- Howden, E. J., Fassett, R. G., Isbel, N. M. and Coombes, J. S.** (2012). Exercise training in chronic kidney disease patients. *Sports Med. Auckl. NZ* **42**, 473–488.
- Hudson, B. I., Carter, A. M., Harja, E., Kalea, A. Z., Arriero, M., Yang, H., Grant, P. J. and Schmidt, A. M.** (2008). Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J.* **22**, 1572–1580.
- Huie, R. E. and Padmaja, S.** (1993). The Reaction of no With Superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* **18**, 195–199.
- Hyogo, H. and Yamagishi, S.** (2008). Advanced glycation end products (AGEs) and their involvement in liver disease. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 969–972.

I

- Iles, K. E. and Forman, H. J.** (2002). Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol. Res.* **26**, 95–105.
- Ingram, V. M.** (1956). A Specific Chemical Difference Between the Globins of Normal Human and Sickle-Cell Anæmia Hæmoglobin. *Nature* **178**, 792–794.
- Ingram, V. M.** (1957). Gene Mutations in Human Hæmoglobin: the Chemical Difference Between Normal and Sickle Cell Hæmoglobin. *Nature* **180**, 326–328.
- Irving, R. A., Noakes, T. D., Burger, S. C., Myburgh, K. H., Querido, D. and van Zyl Smit, R.** (1990). Plasma volume and renal function during and after ultramarathon running. *Med. Sci. Sports Exerc.* **22**, 581–587.
- Ivey, M. E., Osman, N. and Little, P. J.** (2008). Endothelin-1 signalling in vascular smooth muscle: Pathways controlling cellular functions associated with atherosclerosis. *Atherosclerosis* **199**, 237–247.

J

- Jama, A. H. A., Salem, A. H. A. and Dabbous, I. A. A.** (2002). Massive splenic infarction in Saudi patients with sickle cell anemia: A unique manifestation. *Am. J. Hematol.* **69**, 205–209.
- Jansen, T., Hortmann, M., Oelze, M., Opitz, B., Steven, S., Schell, R., Knorr, M., Karbach, S., Schuhmacher, S., Wenzel, P., et al.** (2010). Conversion of biliverdin to bilirubin by biliverdin reductase contributes to endothelial cell protection by heme oxygenase-1—evidence for direct and indirect antioxidant actions of bilirubin. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **49**, 186–195.
- Jara, M., Vivancos, A. P., Calvo, I. A., Moldón, A., Sansó, M. and Hidalgo, E.** (2007). The Peroxiredoxin Tpx1 Is Essential as a H₂O₂ Scavenger during Aerobic Growth in Fission Yeast. *Mol. Biol. Cell* **18**, 2288–2295.
- Ji, L. L., Gomez-Cabrera, M.-C., Steinhafel, N. and Vina, J.** (2004). Acute exercise activates nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB J.* **18**, 1499–1506.

- Jilma, B., Eichler, H.-G., Stohlawetz, P., Dirnberger, E., Kapiotis, S., Wagner, O. F., Schutz, W. and Krejcy, K.** (1997). Effects of exercise on circulating vascular adhesion molecules in healthy men. *Immunobiology* **197**, 505–512.
- Johnson, L. R., Rush, J. W. E., Turk, J. R., Price, E. M. and Laughlin, M. H.** (2001). Short-term exercise training increases ACh-induced relaxation and eNOS protein in porcine pulmonary arteries. *J. Appl. Physiol.* **90**, 1102–1110.
- Jones, S. R., Binder, R. A. and Donowho, E. M.** (1970). Sudden death in sickle-cell trait. *N. Engl. J. Med.* **282**, 323–325.
- Jyrkkänen, H.-K., Kansanen, E., Inkala, M., Kivelä, A. M., Hurttila, H., Heinonen, S. E., Goldsteins, G., Jauhiainen, S., Tiainen, S., Makkonen, H., et al.** (2008). Nrf2 Regulates Antioxidant Gene Expression Evoked by Oxidized Phospholipids in Endothelial Cells and Murine Arteries In Vivo. *Circ. Res.* **103**, e1–e9.

K

- Kalambur, V. S., Mahaseth, H., Bischof, J. C., Kielbik, M. C., Welch, T. E., Vilbäck, Å., Swanlund, D. J., Hebbel, R. P., Belcher, J. D. and Vercellotti, G. M.** (2004). Microvascular blood flow and stasis in transgenic sickle mice: Utility of a dorsal skin fold chamber for intravital microscopy. *Am. J. Hematol.* **77**, 117–125.
- Kalea, A. Z., Reiniger, N., Yang, H., Arriero, M., Schmidt, A. M. and Hudson, B. I.** (2009). Alternative splicing of the murine receptor for advanced glycation end-products (RAGE) gene. *FASEB J.* **23**, 1766–1774.
- Kalinina, N., Agrotis, A., Antropova, Y., DiVitto, G., Kanellakis, P., Kostolias, G., Ilyinskaya, O., Tararak, E. and Bobik, A.** (2004). Increased expression of the DNA-binding cytokine HMGB1 in human atherosclerotic lesions: role of activated macrophages and cytokines. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 2320–2325.
- Kanakoudi-Tsakalidou, F., Athanassiou-Metaxa, M., Tzimouli, V., Koussi, A., Taparkou, A., Trachana, M. and Tsatra, I.** (1997). Elevated Circulating Indicators of Persistent Inflammation and Endothelial Cell Activation in Patients with Sickle Cell Disease. *Pediatr. Res.* **41**, 766–766.
- Kanczler, J. M., Millar, T. M., Bodamyali, T., Blake, D. R. and Stevens, C. R.** (2003). Xanthine oxidase mediates cytokine-induced, but not hormone-induced bone resorption. *Free Radic. Res.* **37**, 179–187.
- Kaneda, H., Taguchi, J., Ogasawara, K., Aizawa, T. and Ohno, M.** (2002). Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* **162**, 221–225.
- Kang, J., Jeong, M. G., Oh, S., Jang, E. J., Kim, H. K. and Hwang, E. S.** (2014). A FoxO1-dependent, but NRF2-independent induction of heme oxygenase-1 during muscle atrophy. *FEBS Lett.* **588**, 79–85.
- Kanu, A., Whitfield, J. and Leffler, C. W.** (2006). Carbon monoxide contributes to hypotension-induced cerebrovascular vasodilation in piglets. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, H2409–H2414.

- Kargotich, S., Goodman, C., Keast, D. and Morton, A. R.** (1998). The influence of exercise-induced plasma volume changes on the interpretation of biochemical parameters used for monitoring exercise, training and sport. *Sports Med. Auckl. NZ* **26**, 101–117.
- Karlsson, J., Taft, C., Rydén, A., Sjöström, L. and Sullivan, M.** (2007). Ten-year trends in health-related quality of life after surgical and conventional treatment for severe obesity: the SOS intervention study. *Int. J. Obes.* **31**, 1248–1261.
- Kato, G. J., Martyr, S., Blackwelder, W. C., Nichols, J. S., Coles, W. A., Hunter, L. A., Brennan, M.-L., Hazen, S. L. and Gladwin, M. T.** (2005). Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *Br. J. Haematol.* **130**, 943–953.
- Kato, G. J., Gladwin, M. T. and Steinberg, M. H.** (2007). Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev.* **21**, 37–47.
- Kaul, D. K. and Fabry, M. E.** (2004). In Vivo Studies of Sickle Red Blood Cells. *Microcirculation* **11**, 153–165.
- Kaul, D. K. and Hebbel, R. P.** (2000). Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J. Clin. Invest.* **106**, 411–420.
- Kaul, D. K. and Nagel, R. L.** (1993). Sickle cell vasoocclusion: many issues and some answers. *Experientia* **49**, 5–15.
- Kaul, D. K., Fabry, M. E. and Nagel, R. L.** (1989). Erythrocytic and vascular factors influencing the microcirculatory behavior of blood in sickle cell anemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **565**, 316–326.
- Kaul, D. K., Liu, X.-D., Fabry, M. E. and Nagel, R. L.** (2000). Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in transgenic sickle mouse. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **278**, H1799–H1806.
- Kawanishi, N., Yano, H., Yokogawa, Y. and Suzuki, K.** (2010). 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**, 105–118.
- Ketelhut, R. G., Franz, I. W. and Scholze, J.** (2004). Regular exercise as an effective approach in antihypertensive therapy. *Med. Sci. Sports Exerc.* **36**, 4–8.
- Kim, J., Cha, Y.-N. and Surh, Y.-J.** (2010). A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **690**, 12–23.
- Kingwell, B. A., Arnold, P. J., Jennings, G. L. and Dart, A. M.** (1997). Spontaneous running increases aortic compliance in Wistar-Kyoto rats. *Cardiovasc. Res.* **35**, 132–137.
- Kleemann, R., Zadelaar, S. and Kooistra, T.** (2008). Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc. Res.* **79**, 360–376.
- Knight, J. A.** (2000). Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **30**, 145–158.

- Kojda, G. and Hambrecht, R.** (2005). Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc. Res.* **67**, 187–197.
- Kramer, M. S., Rooks, Y. and Pearson, H. A.** (1978). Growth and Development in Children with Sickle-Cell Trait. *N. Engl. J. Med.* **299**, 686–689.
- Kramsch, D. M., Aspen, A. J., Abramowitz, B. M., Kremendahl, T. and Hood, W. B. J.** (1981). Reduction of Coronary Atherosclerosis by Moderate Conditioning Exercise in Monkeys on an Atherogenic Diet. *N. Engl. J. Med.* **305**, 1483–1489.
- Krishnan, S., Setty, Y., Betal, S. G., Vijender, V., Rao, K., Dampier, C. and Stuart, M.** (2010). 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.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. and Aster, J. C.** (2014). Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition.
- Kuvibidila, S., Gardner, R., Ode, D., Yu, L., Lane, G. and Warriar, R. P.** (1997). Tumor necrosis factor alpha in children with sickle cell disease in stable condition. *J. Natl. Med. Assoc.* **89**, 609–615.
- Kuvibidila, S. R., Sandoval, M., Lao, J., Velez, M., Yu, L., Ode, D., Gardner, R., Lane, G. and Warriar, R. P.** (2006). Plasma zinc levels inversely correlate with vascular cell adhesion molecule-1 concentration in children with sickle cell disease. *J. Natl. Med. Assoc.* **98**, 1263–1272.

L

- Lai, Y.-C., Potoka, K. C., Champion, H. C., Mora, A. L. and Gladwin, M. T.** (2014). Pulmonary Arterial Hypertension: The Clinical Syndrome. *Circ. Res.* **115**, 115–130.
- Laires, M. J., Madeira, F., Sérgio, J., Colaço, C., Vaz, C., Felisberto, G. M., Neto, I., Breitenfeld, L., Bicho, M. and Manso, C.** (1993). Preliminary study of the relationship between plasma and erythrocyte magnesium variations and some circulating pro-oxidant and antioxidant indices in a standardized physical effort. *Magnes. Res.* **6**, 233–238.
- Lamarre, Y., Romana, M., Waltz, X., Lalanne-Mistrih, M.-L., Tressières, B., Divialle-Doumdo, L., Hardy-Dessources, M.-D., Vent-Schmidt, J., Petras, M., Broquere, C., et al.** (2012). Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease. *Haematologica* **97**, 1641–1647.
- Lamas, S. and Rodríguez-Puyol, D.** (2012). Endothelial Control of Vasomotor Tone: The Kidney Perspective. *Semin. Nephrol.* **32**, 156–166.
- Lanaro, C., Franco-Penteado, C. F., Albuquerque, D. M., Saad, S. T. O., Conran, N. and Costa, F. F.** (2009). 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**, 235–242.
- Lane, P. and Githens, J.** (1985). Splenic syndrome at mountain altitudes in sickle cell trait: Its occurrence in nonblack persons. *JAMA* **253**, 2251–2254.
- Laub, M., Hvid-Jacobsen, K., Hovind, P., Kanstrup, I. L., Christensen, N. J. and Nielsen, S. L.** (1993). Spleen emptying and venous hematocrit in humans during exercise. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **74**, 1024–1026.

- Le Gallais, D., Prefaut, C., Mercier, J., Bile, A., Bogui, P. and Lonsdorfer, J.** (1994). Sick cell Trait as a Limiting Factor for High-Level Performance in a Semi-Marathon. *Int. J. Sports Med.* **15**, 399–402.
- Le Gallais, D., Lonsdorfer, J., Bogui, P. and Fattoum, S.** (2007). Point:Counterpoint: Sick cell trait should/should not be considered asymptomatic and as a benign condition during physical activity. *J. Appl. Physiol.* **103**, 2137–2138.
- Le Lay, S., Simard, G., Martinez, M. C., Andriantsitohaina, R., Le Lay, S., Simard, G., Martinez, M. C. and Andriantsitohaina, R.** (2014). Oxidative Stress and Metabolic Pathologies: From an Adipocentric Point of View, Oxidative Stress and Metabolic Pathologies: From an Adipocentric Point of View. *Oxidative Med. Cell. Longev. Oxidative Med. Cell. Longev.* **2014**, e908539.
- Lenaz, G.** (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1366**, 53–67.
- Leon, A. S. and Bloor, C. M.** (1968). Effects of exercise and its cessation on the heart and its blood supply. *J. Appl. Physiol.* **24**, 485–490.
- Ley, K. and Tedder, T. F.** (1995). Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *J. Immunol.* **155**, 525–528.
- Li, C. and Jackson, R. M.** (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **282**, C227–C241.
- Liem, R. I., Nevin, M. A., Prestridge, A., Young, L. T. and Thompson, A. A.** (2009). Functional capacity in children and young adults with sickle cell disease undergoing evaluation for cardiopulmonary disease. *Am. J. Hematol.* **84**, 645–649.
- Liem, R. I., Reddy, M., Pelligra, S. A., Savant, A. P., Fernhall, B., Rodeghier, M. and Thompson, A. A.** (2015a). Reduced fitness and abnormal cardiopulmonary responses to maximal exercise testing in children and young adults with sickle cell anemia. *Physiol. Rep.* **3**,.
- Liem, R. I., Onyejekwe, K., Olszewski, M., Nchekwube, C., Zaldivar, F. P., Radom-Aizik, S., Rodeghier, M. J. and Thompson, A. A.** (2015b). The acute phase inflammatory response to maximal exercise testing in children and young adults with sickle cell anaemia. *Br. J. Haematol.* **171**, 854–861.
- Lin, L., Park, S. and Lakatta, E. G.** (2009). RAGE signaling in inflammation and arterial aging. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **14**, 1403–1413.
- Linden, K. C., Wadley, G. D., Garnham, A. P. and McConell, G. K.** (2011). Effect of l-arginine infusion on glucose disposal during exercise in humans. *Med. Sci. Sports Exerc.* **43**, 1626–1634.
- Liu, Y., Ma, Y., Wang, R., Xia, C., Zhang, R., Lian, K., Luan, R., Sun, L., Yang, L., Lau, W. B., et al.** (2011). Advanced glycation end products accelerate ischemia/reperfusion injury through receptor of advanced end product/nitrative thioredoxin inactivation in cardiac microvascular endothelial cells. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 1769–1778.
- Lubin, B., Chiu, D., Bastacky, J., Roelofsen, B. and Van Deenen, L. L.** (1981). Abnormalities in membrane phospholipid organization in sickled erythrocytes. *J. Clin. Invest.* **67**, 1643–1649.

Lux, S. E., John, K. M. and Karnovsky, M. J. (1976). Irreversible deformation of the spectrin-actin lattice in irreversibly sickled cells. *J. Clin. Invest.* **58**, 955–963.

M

Macdonald, R. (1977). Red cell 2,3-diphosphoglycerate and oxygen affinity. *Anaesthesia* **32**, 544–553.

Machado, R. F., Martyr, S., Kato, G. J., Barst, R. J., Anthi, A., Robinson, M. R., Hunter, L., Coles, W., Nichols, J., Hunter, C., et al. (2005). Sildenafil therapy in patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *Br. J. Haematol.* **130**, 445–453.

Mackinnon, L. T. (1997). Immunity in athletes. *Int. J. Sports Med.* **18 Suppl 1**, S62-68.

Maeda, S., Miyauchi, T., Iemitsu, M., Tanabe, T., Goto, K., Yamaguchi, I. and Matsuda, M. (2004). Endothelin receptor antagonist reverses decreased NO system in the kidney in vivo during exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **286**, E609-614.

Magid, D., Fishman, E. and Siegelman, S. (1984). Computed tomography of the spleen and liver in sickle cell disease. *Am. J. Roentgenol.* **143**, 245–249.

Mairbaurl, H., Humpeler, E., Schwaberger, G. and Pessenhofer, H. (1983). Training-dependent changes of red cell density and erythrocytic oxygen transport. *J. Appl. Physiol.* **55**, 1403–1407.

Majerczak, J., Rychlik, B., Grzelak, A., Grzmił, P., Karasinski, J., Pierzchalski, P., Pulaski, L., Bartosz, G. and Zoladz, J. A. (2010). 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. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* **61**, 743–751.

Manci, E. A., Hillery, C. A., Bodian, C. A., Zhang, Z. G., Luty, G. A. and Collier, B. S. (2006). Pathology of Berkeley sickle cell mice: similarities and differences with human sickle cell disease. *Blood* **107**, 1651–1658.

Manci, E. A., Hyacinth, H. I., Capers, P. L., Archer, D. R., Pitts, S., Ghosh, S., Patrickson, J., Titford, M. E., Ofori-Acquah, S. F. and Hibbert, J. M. (2014). High protein diet attenuates histopathologic organ damage and vascular leakage in transgenic murine model of sickle cell anemia. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **239**, 966–974.

Manfredini, V., Lazzaretti, L. L., Griebeler, I. H., Santin, A. P., Brandão, V. D. M., Wagner, S., Castro, S. M., Peralba, M. do C. R. and Benfato, M. S. (2008). Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. *J. Natl. Med. Assoc.* **100**, 897–902.

Mansi, I. A. and Rosner, F. (2002). Myocardial infarction in sickle cell disease. *J. Natl. Med. Assoc.* **94**, 448–452.

Manwani, D. and Frenette, P. S. (2013). Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. *Blood* **122**, 3892–3898.

Marieb, E. N. (2005). Chapitre 19 - Le système cardiovasculaire: les vaisseaux sanguins. In *Anatomie et physiologie humaines*, p. 752. Pearson Education.

- Marotta, C. A., Wilson, J. T., Forget, B. G. and Weissman, S. M.** (1977). Human beta-globin messenger RNA. III. Nucleotide sequences derived from complementary DNA. *J. Biol. Chem.* **252**, 5040–5053.
- Marsh, S. A. and Coombes, J. S.** (2005). Exercise and the endothelial cell. *Int. J. Cardiol.* **99**, 165–169.
- Martin, C., Pialoux, V., Faes, C., Charrin, E., Skinner, S. and Connes, P.** (2015). Does physical activity increase or decrease the risk of sickle cell disease complications? *Br. J. Sports Med.* bjsports-2015-095317.
- Maskrey, B. H., Megson, I. L., Whitfield, P. D. and Rossi, A. G.** (2011). Mechanisms of Resolution of Inflammation A Focus on Cardiovascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1001–1006.
- Maughan, R. J., Donnelly, A. E., Gleeson, M., Whiting, P. H., Walker, K. A. and Clough, P. J.** (1989). Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after a downhill run. *Muscle Nerve* **12**, 332–336.
- McAllister, R. M., Kimani, J. K., Webster, J. L., Parker, J. L. and Laughlin, M. H.** (1996). Effects of exercise training on responses of peripheral and visceral arteries in swine. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* **1985** **80**, 216–225.
- McConnell, S. C., Huo, Y., Liu, S. and Ryan, T. M.** (2011). Human Globin Knock-in Mice Complete Fetal-to-Adult Hemoglobin Switching in Postnatal Development. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 876–883.
- McMurray, R. G.** (1983). Plasma volume changes during submaximal swimming. *Eur. J. Appl. Physiol.* **51**, 347–356.
- McNaughton, L. R.** (1989). Plasma volume responses associated with a sprint triathlon in novice triathletes. *Int. J. Sports Med.* **10**, 161–164.
- Medzhitov, R.** (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–435.
- Meloche, J., Courchesne, A., Barrier, M., Carter, S., Bissierier, M., Paulin, R., Lauzon-Joset, J.-F., Breuils-Bonnet, S., Tremblay, É., Biardel, S., et al.** (2013). Critical role for the advanced glycation end-products receptor in pulmonary arterial hypertension etiology. *J. Am. Heart Assoc.* **2**, e005157.
- Mereles, D., Ehlken, N., Kreuzer, S., Ghofrani, S., Hoeper, M. M., Halank, M., Meyer, F. J., Karger, G., Buss, J., Juenger, J., et al.** (2006). Exercise and Respiratory Training Improve Exercise Capacity and Quality of Life in Patients With Severe Chronic Pulmonary Hypertension. *Circulation* **114**, 1482–1489.
- Merry, T. L., Lynch, G. S. and McConell, G. K.** (2010). Downstream mechanisms of nitric oxide-mediated skeletal muscle glucose uptake during contraction. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **299**, R1656–R1665.
- Michaels, L. A., Ohene-Frempong, K., Zhao, H. and Douglas, S. D.** (1998). Serum Levels of Substance P Are Elevated in Patients With Sickle Cell Disease and Increase Further During Vaso-Occlusive Crisis. *Blood* **92**, 3148–3151.

- Michailidis, Y., Jamurtas, A. Z., Nikolaidis, M. G., Fatouros, I. G., Koutedakis, Y., Papassotiriou, I. and Kouretas, D.** (2007). Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* **39**, 1107–1113.
- Michel, T. and Feron, O.** (1997). Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J. Clin. Invest.* **100**, 2146–2152.
- Miles, D. S., Sawka, M. N., Glaser, R. M. and Petrofsky, J. S.** (1983). Plasma volume shifts during progressive arm and leg exercise. *J. Appl. Physiol.* **54**, 491–495.
- Millis, R. M., Baker, F. W., Ertugrul, L., Douglas, R. M. and Sexcius, L.** (1994). Physical performance decrements in children with sickle cell anemia. *J. Natl. Med. Assoc.* **86**, 113–116.
- Milne, G. L., Yin, H., Brooks, J. D., Sanchez, S., Jackson Roberts II, L. and Morrow, J. D.** (2007). Quantification of F2-Isoprostanes in Biological Fluids and Tissues as a Measure of Oxidant Stress. In (ed. Enzymology, B.-M. in), pp. 113–126. Academic Press.
- Milner, P. F., Miller, C., Grey, R., Seakins, M., DeJong, W. W. and Went, L. N.** (1970). Hemoglobin O Arab in Four Negro Families and Its Interaction with Hemoglobin S and Hemoglobin C. *N. Engl. J. Med.* **283**, 1417–1425.
- Minniti, C. P., Machado, R. F., Coles, W. A., Sachdev, V., Gladwin, M. T. and Kato, G. J.** (2009). Endothelin receptor antagonists for pulmonary hypertension in adult patients with sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* **147**, 737–743.
- Minniti, C. P., Eckman, J., Sebastiani, P., Steinberg, M. H. and Ballas, S. K.** (2010). Leg Ulcers in Sickle Cell Disease. *Am. J. Hematol.* **85**, 831–833.
- Mitchell, B. L.** (2007). Sickle cell trait and sudden death--bringing it home. *J. Natl. Med. Assoc.* **99**, 300–305.
- Miyata, T., Takizawa, S. and Strihou, C. van Y. de** (2011). Hypoxia. 1. Intracellular sensors for oxygen and oxidative stress: novel therapeutic targets. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **300**, C226–C231.
- Miyazaki, H., Oh-ishi, S., Ookawara, T., Kizaki, T., Toshinai, K., Ha, S., Haga, S., Ji, L. L. and Ohno, H.** (2001). Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **84**, 1–6.
- Möckel, M., Ulrich, N. V., Jr, G. H., Röcker, L., Hansen, R., Riess, H., Patscheke, H., Störk, T., Frei, U. and Ruf, A.** (2001). Platelet Activation Through Triathlon Competition in Ultra-Endurance Trained Athletes: Impact of Thrombin and Plasmin Generation and Catecholamine Release. *Int. J. Sports Med.* **22**, 337–343.
- Mohammed, F. A., Mahdi, N., Sater, M. A., Al-Ola, K. and Almawi, W. Y.** (2010). The relation of C-reactive protein to vasoocclusive crisis in children with sickle cell disease. *Blood Cells. Mol. Dis.* **45**, 293–296.
- Mohan, J. S., Lip, G. Y. H., Bareford, D. and Blann, A. D.** (2006). Platelet P-selectin and platelet mass, volume and component in sickle cell disease: Relationship to genotype. *Thromb. Res.* **117**, 623–629.
- Moheeb, H., Wali, Y. A. and El-Sayed, M. S.** (2007). Physical fitness indices and anthropometrics profiles in schoolchildren with sickle cell trait/disease. *Am. J. Hematol.* **82**, 91–97.

- Monchanin, G., Connes, P., Wouassi, D., Francina, A., Djoda, B., Banga, P. E., Owona, F. X., Thiriet, P., Massarelli, R. and Martin, C.** (2005). Hemorheology, Sickle Cell Trait, and [alpha]-Thalassemia in Athletes: Effects of Exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **37**, 1086–1092.
- Monchanin, G., Serpero, L. D., Connes, P., Tripette, J., Wouassi, D., Bezin, L., Francina, A., Ngongang, J., De la Peña, M., Massarelli, R., et al.** (2007). Effects of progressive and maximal exercise on plasma levels of adhesion molecules in athletes with sickle cell trait with or without α -thalassemia. *J. Appl. Physiol.* **102**, 169–173.
- Monplaisir, N., Merault, G., Poyart, C., Rhoda, M. D., Craescu, C., Vidaud, M., Galacteros, F., Blouquit, Y. and Rosa, J.** (1986). Hemoglobin S Antilles: a variant with lower solubility than hemoglobin S and producing sickle cell disease in heterozygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 9363–9367.
- Morris, C. R.** (2011). Vascular risk assessment in patients with sickle cell disease. *Haematologica* **96**, 1–5.
- Morris, C. R., Suh, J. H., Hagar, W., Larkin, S., Bland, D. A., Steinberg, M. H., Vichinsky, E. P., Shigenaga, M., Ames, B., Kuypers, F. A., et al.** (2008). Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood* **111**, 402–410.
- Muller, W. A.** (2011). Mechanisms of Leukocyte Transendothelial Migration. *Annu. Rev. Pathol.* **6**, 323–344.
- Muller, W. A., Weigl, S. A., Deng, X. and Phillips, D. M.** (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* **178**, 449–460.
- Müller, S., Ronfani, L. and Bianchi, M. E.** (2004). Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *J. Intern. Med.* **255**, 332–343.
- N**
- Nagashima, K., Nose, H., Yoshida, T., Kawabata, T., Oda, Y., Yorimoto, A., Uemura, O. and Morimoto, T.** (1995). Relationship between atrial natriuretic peptide and plasma volume during graded exercise with water immersion. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **78**, 217–224.
- Nath, K. A. and Hebbel, R. P.** (2015). Sickle cell disease: renal manifestations and mechanisms. *Nat. Rev. Nephrol.* **11**, 161–171.
- Nebor, D., Bowers, A., Hardy-Dessources, M.-D., Knight-Madden, J., Romana, M., Reid, H., Barthélémy, J.-C., Cumming, V., Hue, O., Elion, J., et al.** (2011). Frequency of pain crises in sickle cell anemia and its relationship with the sympatho-vagal balance, blood viscosity and inflammation. *Haematologica* **96**, 1589–1594.
- Neeper, M., Schmidt, A. M., Brett, J., Yan, S. D., Wang, F., Pan, Y. C., Elliston, K., Stern, D. and Shaw, A.** (1992). Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 14998–15004.
- Neubauer, O., König, D. and Wagner, K.-H.** (2008). Recovery after an Ironman triathlon: sustained inflammatory responses and muscular stress. *Eur. J. Appl. Physiol.* **104**, 417–426.

- Nielsen, A. R. and Pedersen, B. K.** (2007). The biological roles of exercise-induced cytokines: IL-6, IL-8, and IL-15. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **32**, 833–839.
- Nieman, D. C.** (1994). Exercise, Infection and Immunity. *Int. J. Sports Med.* **15**, S131–S141.
- Nieman, D. C., Henson, D. A., Smith, L. L., Utter, A. C., Vinci, D. M., Davis, J. M., Kaminsky, D. E. and Shute, M.** (2001). Cytokine changes after a marathon race. *J. Appl. Physiol.* **91**, 109–114.
- Nikolaidis, M. G., Kyparos, A., Hadziioannou, M., Panou, N., Samaras, L., Jamurtas, A. Z. and Kouretas, D.** (2007). Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls. *Appl. Physiol. Nutr. Metab. Physiol. Appliquée Nutr. Métabolisme* **32**, 197–205.
- Nishank, S. S.** (2015). Association of DNA Damage Repair Gene Polymorphisms hOGG1, XRCC1 and p53 with Sickle Cell Disease Patients in India. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **7**,.
- Novosadová, J.** (1977). The changes in hematocrit, hemoglobin, plasma volume and proteins during and after different types of exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **36**, 223–230.
- Nur, E., Brandjes, D. P., Schnog, J.-J. B., Otten, H.-M., Fijnvandraat, K., Schalkwijk, C. G., Biemond, B. J. and Group, the C. S.** (2010). Plasma levels of advanced glycation end products are associated with haemolysis-related organ complications in sickle cell patients. *Br. J. Haematol.* **151**, 62–69.
- Nur, E., Biemond, B. J., Otten, H.-M., Brandjes, D. P., Schnog, J.-J. B. and Group, the C. S.** (2011a). Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. *Am. J. Hematol.* **86**, 484–489.
- Nur, E., van Beers, E. J., Martina, S., Cuccovillo, I., Otten, H.-M., Schnog, J.-J. B., Meijers, J. C. M., Mantovani, A., Brandjes, D. P., Bottazzi, B., et al.** (2011b). Plasma levels of pentraxin-3, an acute phase protein, are increased during sickle cell painful crisis. *Blood Cells. Mol. Dis.* **46**, 189–194.

O

- Odièvre, M.-H., Verger, E., Silva-Pinto, A. C. and Elion, J.** (2011). Pathophysiological insights in sickle cell disease. *Indian J. Med. Res.* **134**, 532.
- Orlova, V. V., Choi, E. Y., Xie, C., Chavakis, E., Bierhaus, A., Ihanus, E., Ballantyne, C. M., Gahmberg, C. G., Bianchi, M. E., Nawroth, P. P., et al.** (2007). A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *EMBO J.* **26**, 1129–1139.
- Osarogiagbon, U. R., Choong, S., Belcher, J. D., Vercellotti, G. M., Paller, M. S. and Hebbel, R. P.** (2000). Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. *Blood* **96**, 314–320.
- Osiecki, H.** (2004). The role of chronic inflammation in cardiovascular disease and its regulation by nutrients. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* **9**, 32–53.
- Østergård, T., Nyholm, B., Hansen, T. K., Rasmussen, L. M., Ingerslev, J., Sørensen, K. E., Bøtker, H. E., Saltin, B. and Schmitz, O.** (2006). Endothelial function and biochemical vascular markers in first-degree relatives of type 2 diabetic patients: the effect of exercise training. *Metabolism* **55**, 1508–1515.

Ostrowski, K., Hermann, C., Bangash, A., Schjerling, P., Nielsen, J. N. and Pedersen, B. K. (1998). A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *J. Physiol.* **513**, 889–894.

Ould Amar, A., Pi Gibert, A., Darmon, O., Besse, P., Cénac, A. and Césaire, R. (1999). AS heterozygote hemoglobinopathy and coronary risk. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* **92**, 1727–1732.

Oztas, Y., Durukan, I., Unal, S. and Ozgunes, N. (2012). Plasma protein oxidation is correlated positively with plasma iron levels and negatively with hemolysate zinc levels in sickle-cell anemia patients. *Int. J. Lab. Hematol.* **34**, 129–135.

P

Pack-Mabien, A. V. and Imran, H. (2013). Benefits of Delayed Fetal Hemoglobin (HbF) Switching in Sickle Cell Disease (SCD): A Case Report and Review of the Literature. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **35**, e347–e349.

Palace, V. P., Khaper, N., Qin, Q. and Singal, P. K. (1999). Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 746–761.

Palmieri, B. and Sblendorio, V. (2007). Oxidative stress tests: overview on reliability and use. Part I. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **11**, 309–342.

Panagiotakos, D. B., Pitsavos, C., Chrysohoou, C., Kavouras, S. and Stefanadis, C. (2005). The associations between leisure-time physical activity and inflammatory and coagulation markers related to cardiovascular disease: the ATTICA Study. *Prev. Med.* **40**, 432–437.

Paravicini, T. M. and Touyz, R. M. (2008). NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* **31**, S170–S180.

Pastva, A., Estell, K., Schoeb, T. R., Atkinson, T. P. and Schwiebert, L. M. (2004). Aerobic Exercise Attenuates Airway Inflammatory Responses in a Mouse Model of Atopic Asthma. *J. Immunol.* **172**, 4520–4526.

Pászty, C., Brion, C. M., Mancini, E., Witkowska, H. E., Stevens, M. E., Mohandas, N. and Rubin, E. M. (1997). Transgenic Knockout Mice with Exclusively Human Sickle Hemoglobin and Sickle Cell Disease. *Science* **278**, 876–878.

Pathare, A., Kindi, S. A., Daar, S. and Dennison, D. (2003). Cytokines in sickle cell disease. *Hematol. Amst. Neth.* **8**, 329–337.

Pathare, A., Al Kindi, S., Alnaqdy, A. A., Daar, S., Knox-Macaulay, H. and Dennison, D. (2004). Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *Am. J. Hematol.* **77**, 323–328.

Pauling, L. and Itano, H. A. (1949). Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* **109**, 443.

Pearson, H. A. (1977). Sickle Cell Anemia and Severe Infections Due to Encapsulated Bacteria. *J. Infect. Dis.* **136**, S25–S30.

Pearson, H. A., Spencer, R. P. and Cornelius, E. A. (1969). Functional Asplenia in Sickle-Cell Anemia. *N. Engl. J. Med.* **281**, 923–926.

- Pedersen, B. K. and Fischer, C. P.** (2007). Beneficial health effects of exercise – the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 152–156.
- Petersen, A. M. W. and Pedersen, B. K.** (2006). The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* **57 Suppl 10**, 43–51.
- Pianosì, P., Charge, T. D., Esseltine, D. W. and Coates, A. L.** (1993). Pulse oximetry in sickle cell disease. *Arch. Dis. Child.* **68**, 735–738.
- Piel, F. B., Patil, A. P., Howes, R. E., Nyangiri, O. A., Gething, P. W., Williams, T. N., Weatherall, D. J. and Hay, S. I.** (2010). Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat. Commun.* **1**, 104.
- Piel, F. B., Patil, A. P., Howes, R. E., Nyangiri, O. A., Gething, P. W., Dewi, M., Temperley, W. H., Williams, T. N., Weatherall, D. J. and Hay, S. I.** (2013). Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *Lancet* **381**, 142–151.
- Pinho, R. A., Andrades, M. E., Oliveira, M. R., Pirola, A. C., Zago, M. S., Silveira, P. C. L., Dal-Pizzol, F. and Moreira, J. C. F.** (2006). Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol. Int.* **30**, 848–853.
- Platt, O. S.** (1982). Exercise-induced hemolysis in sickle cell anemia: shear sensitivity and erythrocyte dehydration. *Blood* **59**, 1055–1060.
- Platt, O. S.** (2000a). The acute chest syndrome of sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1904–1907.
- Platt, O. S.** (2000b). Sickle cell anemia as an inflammatory disease. *J. Clin. Invest.* **106**, 337–338.
- Platt, O. S., Orkin, S. H., Dover, G., Beardsley, G. P., Miller, B. and Nathan, D. G.** (1984). Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. *J. Clin. Invest.* **74**, 652–656.
- Platt, O. S., Thorington, B. D., Brambilla, D. J., Milner, P. F., Rosse, W. F., Vichinsky, E. and Kinney, T. R.** (1991). Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N. Engl. J. Med.* **325**, 11–16.
- Platt, O. S., Brambilla, D. J., Rosse, W. F., Milner, P. F., Castro, O., Steinberg, M. H. and Klug, P. P.** (1994). Mortality In Sickle Cell Disease – Life Expectancy and Risk Factors for Early Death. *N. Engl. J. Med.* **330**, 1639–1644.
- Potoka, K. P. and Gladwin, M. T.** (2015). Vasculopathy and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **308**, L314–L324.
- Powars, D. R., Elliott-Mills, D. D., Chan, L., Niland, J., Hiti, A. L., Opas, L. M. and Johnson, C.** (1991). Chronic renal failure in sickle cell disease: risk factors, clinical course, and mortality. *Ann. Intern. Med.* **115**, 614–620.
- Powers, S. K., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L. L., Martin, D., Herb, R. A. and Dudley, G.** (1994). Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **266**, R375–R380.
- Poyart, C. and Wajcman, H.** (1996). Hemolytic anemias due to hemoglobinopathies. *Mol. Aspects Med.* **17**, 129–142.

Pretzlaff, R. K. (2002). Death of an adolescent athlete with sickle cell trait caused by exertional heat stroke. *Pediatr. Crit. Care Med.* **3**, 308–310.

Pries, A. R. and Kuebler, W. M. (2006). Normal endothelium. *Handb. Exp. Pharmacol.* 1–40.

Q

Qari, M. H., Dier, U. and Mousa, S. A. (2012). Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. *Clin. Appl. Thromb. Off. J. Int. Acad. Clin. Appl. Thromb.* **18**, 195–200.

Quehenberger, P., Bierhaus, A., Fasching, P., Muellner, C., Klevesath, M., Hong, M., Stier, G., Sattler, M., Schleicher, E., Speiser, W., et al. (2000). Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes* **49**, 1561–1570.

R

Radák, Z., Apor, P., Pucso, J., Berkes, I., Ogonovszky, H., Pavlik, G., Nakamoto, H. and Goto, S. (2003). Marathon running alters the DNA base excision repair in human skeletal muscle. *Life Sci.* **72**, 1627–1633.

Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K., Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., et al. (2014). Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay, Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Res. Int. BioMed Res. Int.* **2014**, **2014**, e761264.

Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging* **2**, 219–236.

Rahnama, N., Gaeini, A. A. and Hamedinia, M. R. (2007). Oxidative stress responses in physical education students during 8 weeks aerobic training. *J. Sports Med. Phys. Fitness* **47**, 119–123.

Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K. and Kumar, M. N. V. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J. Controlled Release* **113**, 189–207.

Ravelojaona, M., Féasson, L., Oyono-Enguélé, S., Vincent, L., Djoubairou, B., Ewa'Sama Essoue, C. and Messonnier, L. A. (2015). Evidence for a Profound Remodeling of Skeletal Muscle and Its Microvasculature in Sickle Cell Anemia. *Am. J. Pathol.* **185**, 1448–1456.

Rees, D. C. and Gibson, J. S. (2012). Biomarkers in sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* **156**, 433–445.

Rees, D. C., Williams, T. N. and Gladwin, M. T. (2010). Sickle-cell disease. *The Lancet* **376**, 2018–2031.

Ridha, A., Khan, A., Al-Abayechi, S. and Puthenveetil, V. (2014). Acute compartment syndrome secondary to rhabdomyolysis in a sickle cell trait patient. *The Lancet* **384**, 2172.

Roberts, C. K., Barnard, R. J., Jasman, A. and Balon, T. W. (1999). Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **277**, E390–E394.

- Rohde, L. E. P., Hennekens, C. H. and Ridker, P. M.** (1999). Cross-Sectional Study of Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 and Cardiovascular Risk Factors in Apparently Healthy Men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 1595–1599.
- Rojas, A., Romay, S., González, D., Herrera, B., Delgado, R. and Otero, K.** (2000). Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression by Albumin-Derived Advanced Glycosylation End Products. *Circ. Res.* **86**, e50–e54.
- Romain, A.-J., Brun, J.-F., Varlet-Marie, E. and Raynaud de Mauverger, E.** (2011). Effects of exercise training on blood rheology: a meta-analysis. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **49**, 199–205.
- Rosenthal, M. A. and Parker, D. J.** (1992). Collapse of a young athlete. *Ann. Emerg. Med.* **21**, 1493–1498.
- Ross, R. M., Wadley, G. D., Clark, M. G., Rattigan, S. and McConell, G. K.** (2007). Local Nitric Oxide Synthase Inhibition Reduces Skeletal Muscle Glucose Uptake but Not Capillary Blood Flow During In Situ Muscle Contraction in Rats. *Diabetes* **56**, 2885–2892.
- Roux, E., Mbikou, P. and Fajmut, A.** (2012). Role of Protein Kinase Network in Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle Cell.
- Rusanova, I., Escames, G., Cossio, G., De Borace, R. G., Moreno, B., Chahboune, M., López, L. C., Díez, T. and Acuña-Castroviejo, D.** (2010). Oxidative stress status, clinical outcome, and β -globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. *Eur. J. Haematol.* **85**, 529–537.
- Ruschitzka, F., Moehrlen, U., Quaschnig, T., Lachat, M., Noll, G., Shaw, S., Yang, Z., Teupser, D., Subkowski, T., Turina, M. I., et al.** (2000). Tissue Endothelin-Converting Enzyme Activity Correlates With Cardiovascular Risk Factors in Coronary Artery Disease. *Circulation* **102**, 1086–1092.
- Rush, J. W. E. and Sandiford, S. D.** (2003). Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. *Clin. Biochem.* **36**, 345–351.
- S**
- Sabatier, M. J., Schwark, E. H., Lewis, R., Sloan, G., Cannon, J. and McCully, K.** (2008). Femoral artery remodeling after aerobic exercise training without weight loss in women. *Dyn. Med. DM* **7**, 13.
- Sachdev, V., Machado, R. F., Shizukuda, Y., Rao, Y. N., Sidenko, S., Ernst, I., St. Peter, M., Coles, W. A., Rosing, D. R., Blackwelder, W. C., et al.** (2007). Diastolic Dysfunction Is an Independent Risk Factor for Death in Patients With Sickle Cell Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**, 472–479.
- Sacheck, J. M., Milbury, P. E., Cannon, J. G., Roubenoff, R. and Blumberg, J. B.** (2003). Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 1575–1588.
- Sacheck, J. M., Cannon, J. G., Hamada, K., Vannier, E., Blumberg, J. B. and Roubenoff, R.** (2006). Age-related loss of associations between acute exercise-induced IL-6 and oxidative stress. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **291**, E340–E349.

- Sakhalkar, V. S., Rao, S. P., Weedon, J. and Miller, S. T.** (2004). Elevated plasma sVCAM-1 levels in children with sickle cell disease: Impact of chronic transfusion therapy. *Am. J. Hematol.* **76**, 57–60.
- Saleh, A. W., Hillen, H. F. and Duits, A. J.** (1999). Levels of endothelial, neutrophil and platelet-specific factors in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. *Acta Haematol.* **102**, 31–37.
- Saltin, B.** (1985). Hemodynamic adaptations to exercise. *Am. J. Cardiol.* **55**, D42–D47.
- Santos, J. C. de F., Valentim, I. B., de Araújo, O. R. P., Ataíde, T. da R. and Goulart, M. O. F.** (2013). Development of Nonalcoholic Hepatopathy: Contributions of Oxidative Stress and Advanced Glycation End Products. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 19846–19866.
- Santos-Silva, A., Rebelo, M. I., Castro, E. M. B., Belo, L., Guerra, A., Rego, C. and Quintanilha, A.** (2001). Leukocyte activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. *Clin. Chim. Acta* **306**, 119–126.
- Saxena, A. K., Panhotra, B. R. and Al-Arabi Al-Ghamdi, A. M.** (2004). End-Stage Sickle Cell Nephropathy: Determinants of Reduced Survival of Patients on Long-term Hemodialysis. *Saudi J. Kidney Dis. Transplant. Off. Publ. Saudi Cent. Organ Transplant. Saudi Arab.* **15**, 174–175.
- Schacter, L., Warth, J. A., Gordon, E. M., Prasad, A. and Klein, B. L.** (1988). Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2**, 237–43.
- Schäfer, A., Alp, N. J., Cai, S., Lygate, C. A., Neubauer, S., Eigenthaler, M., Bauersachs, J. and Channon, K. M.** (2004). Reduced Vascular NO Bioavailability in Diabetes Increases Platelet Activation In Vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1720–1726.
- Schechter, A. N.** (2008). Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* **112**, 3927–3938.
- Scheibmeir, H. D., Christensen, K., Whitaker, S. H., Jegaethesan, J., Clancy, R. and Pierce, J. D.** (2005). A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit. Care Nurs.* **21**, 24–28.
- Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R. M. and Muller, W. A.** (2002). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat. Immunol.* **3**, 143–150.
- Schmidt, A. M., Yan, S. D., Brett, J., Mora, R., Nowygrod, R. and Stern, D.** (1993). Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J. Clin. Invest.* **91**, 2155–2168.
- Schmidt, A. M., Yan, S. D., Yan, S. F. and Stern, D. M.** (2000). The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1498**, 99–111.
- Sears, D. A., Udden, M. M. and Thomas, L. J.** (2001). Carboxyhemoglobin levels in patients with sickle-cell anemia: relationship to hemolytic and vasoocclusive severity. *Am. J. Med. Sci.* **322**, 345–348.

- Serjeant, G. R.** (2001). The emerging understanding of sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* **112**, 3–18.
- Serjeant, G. R., Serjeant, B. E., Fraser, R. A., Hambleton, I. R., Higgs, D. R., Kulozik, A. E. and Donaldson, A.** (2011). Hb S- β -Thalassemia: Molecular, Hematological and Clinical Comparisons. *Hemoglobin* **35**, 1–12.
- Shacter, E. and Weitzman, S.** (2002). Chronic inflammation and cancer. *Oncol. Williston Park N* **16**, 217–26, 229–2.
- Sharpe, C. C. and Thein, S. L.** (2011). Sickle cell nephropathy – a practical approach. *Br. J. Haematol.* **155**, 287–297.
- Sheng, K., Shariff, M. and Hebbel, R. P.** (1998). Comparative Oxidation of Hemoglobins A and S. *Blood* **91**, 3467–3470.
- Shephard, R. J.** (2003). Adhesion molecules, catecholamines and leucocyte redistribution during and following exercise. *Sports Med. Auckl. NZ* **33**, 261–284.
- Shireman, P. K. and Pearce, W. H.** (1996). Endothelial cell function: biologic and physiologic functions in health and disease. *Am. J. Roentgenol.* **166**, 7–13.
- Siegel, D., Gustafson, D. L., Dehn, D. L., Han, J. Y., Boonchoong, P., Berliner, L. J. and Ross, D.** (2004). NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1: Role as a Superoxide Scavenger. *Mol. Pharmacol.* **65**, 1238–1247.
- Sies, H.** (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* **82**, 291–295.
- Sigauco-Roussel, D., Demiot, C., Fromy, B., Koitka, A., Lefthériotis, G., Abraham, P. and Saumet, J. L.** (2004). Early endothelial dysfunction severely impairs skin blood flow response to local pressure application in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* **53**, 1564–1569.
- Singh, R., Barden, A., Mori, T. and Beilin, L.** (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* **44**, 129–146.
- Singh, P., Jain, A. and Kaur, G.** (2004). Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol. Cell. Biochem.* **260**, 153–159.
- Singh, V. P., Bali, A., Singh, N. and Jaggi, A. S.** (2014). Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Korean Physiol. Soc. Korean Soc. Pharmacol.* **18**, 1–14.
- Siow, R. C. M., Sato, H. and Mann, G. E.** (1999). Heme oxygenase–carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide? *Cardiovasc. Res.* **41**, 385–394.
- Skaggs, D. L., Kim, S. K., Greene, N. W., Harris, D. and Miller, J. H.** (2001). Differentiation Between Bone Infarction and Acute Osteomyelitis in Children with Sickle-Cell Disease with Use of Sequential Radionuclide Bone-Marrow and Bone Scans. *J Bone Jt. Surg Am* **83**, 1810–1813.
- Smith, J. A.** (1995). Exercise, training and red blood cell turnover. *Sports Med. Auckl. NZ* **19**, 9–31.
- So, B., Kim, H.-J., Kim, J. and Song, W.** (2014). Exercise-induced myokines in health and metabolic diseases. *Integr. Med. Res.* **3**, 172–179.

- Somjee, S. S., Warriar, R. P., Thomson, J. L., Ory-Ascani, J. and Hempe, J. M.** (2005). Advanced glycation end-products in sickle cell anaemia. *Br. J. Haematol.* **128**, 112–118.
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H. and LLeonart, M. E.** (2013). Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res. Rev.* **12**, 376–390.
- Sparkenbaugh, E. and Pawlinski, R.** (2013). Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* **162**,.
- Spiecker, M., Darius, H., Kaboth, K., Hübner, F. and Liao, J. K.** (1998). Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 732–739.
- Sprenger, H., Jacobs, C., Nain, M., Gressner, A. M., Prinz, H., Wesemann, W. and Gemsa, D.** (1992). Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **63**, 188–195.
- Stadtman, E. R.** (1992). Protein oxidation and aging. *Science* **257**, 1220–1224.
- Staikou, C., Stavroulakis, E. and Karmanioulou, I.** (2014). A narrative review of peri-operative management of patients with thalassaemia. *Anaesthesia* **69**, 494–510.
- Stadius van Eps, L. W., Schouten, H., La Porte-Wijsman, L. W. and Struyker Boudier, A. M.** (1967). The influence of red blood cell transfusions on the hyposthenuria and renal hemodynamics of sickle cell anemia. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **17**, 449–461.
- Steinberg, M. H.** (2008). Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. *Sci. World J.* **8**, 1295–1324.
- Steinberg, M. H. and Embury, S. H.** (1986). Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. *Blood* **68**, 985–990.
- Steinberg, M. H., Barton, F., Castro, O., Pegelow, C. H., Ballas, S. K., Kutlar, A., Orringer, E., Bellevue, R., Olivieri, N., Eckman, J., et al.** (2003). Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA* **289**, 1645–1651.
- Steinberg, J. G., Delliaux, S. and Jammes, Y.** (2006). Reliability of different blood indices to explore the oxidative stress in response to maximal cycling and static exercises. *Clin. Physiol. Funct. Imaging* **26**, 106–112.
- Steinberg, J. G., Ba, A., Brégeon, F., Delliaux, S. and Jammes, Y.** (2007). Cytokine and oxidative responses to maximal cycling exercise in sedentary subjects. *Med. Sci. Sports Exerc.* **39**, 964–968.
- Stensvold, D., Slørdahl, S. A. and Wisløff, U.** (2012). Effect of Exercise Training on Inflammation Status Among People with Metabolic Syndrome. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **10**, 267–272.
- Stewart, D. J., Cernacek, P., Costello, K. B. and Rouleau, J. L.** (1992). Elevated endothelin-1 in heart failure and loss of normal response to postural change. *Circulation* **85**, 510–517.

- Stewart, L. K., Flynn, M. G., Campbell, W. W., Craig, B. A., Robinson, J. P., Timmerman, K. L., McFarlin, B. K., Coen, P. M. and Talbert, E. (2007). The influence of exercise training on inflammatory cytokines and C-reactive protein. *Med. Sci. Sports Exerc.* **39**, 1714–1719.
- Strouse, J. J., Hulbert, M. L., DeBaun, M. R., Jordan, L. C. and Casella, J. F. (2006). Primary Hemorrhagic Stroke in Children With Sickle Cell Disease Is Associated With Recent Transfusion and Use of Corticosteroids. *Pediatrics* **118**, 1916–1924.
- Stuart, M. J. and Nagel, R. L. (2004). Sickle-cell disease. *The Lancet* **364**, 1343–1360.
- Sumida, S., Okamura, K., Doi, T., Sakurai, M., Yoshioka, Y. and Sugawa-Katayama, Y. (1997a). No influence of a single bout of exercise on urinary excretion of 8-hydroxy-deoxyguanosine in humans. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **42**, 601–609.
- Sumida, S., Doi, T., Sakurai, M., Yoshioka, Y. and Okamura, K. (1997b). Effect of a single bout of exercise and beta-carotene supplementation on the urinary excretion of 8-hydroxy-deoxyguanosine in humans. *Free Radic. Res.* **27**, 607–618.
- Sun, Z. and Andersson, R. (2002). NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock Augusta Ga* **18**, 99–106.
- Sun, D., Huang, A., Koller, A. and Kaley, G. (1994). Short-term daily exercise activity enhances endothelial NO synthesis in skeletal muscle arterioles of rats. *J. Appl. Physiol.* **76**, 2241–2247.
- Sun, D., Huang, A., Koller, A. and Kaley, G. (1998). Adaptation of flow-induced dilation of arterioles to daily exercise. *Microvasc. Res.* **56**, 54–61.
- Sutera, S. P., Gardner, R. A., Boylan, C. W., Carroll, G. L., Chang, K. C., Marvel, J. S., Kilo, C., Gonen, B. and Williamson, J. R. (1985). Age-related changes in deformability of human erythrocytes. *Blood* **65**, 275–282.
- Suzuki, K., Peake, J., Nosaka, K., Okutsu, M., Abbiss, C. R., Surriano, R., Bishop, D., Quod, M. J., Lee, H., Martin, D. T., et al. (2006). Changes in markers of muscle damage, inflammation and HSP70 after an Ironman triathlon race. *Eur. J. Appl. Physiol.* **98**, 525–534.
- Sydenstricker, V. P. (1924). Further observations on sickle cell anemia. *J. Am. Med. Assoc.* **83**, 12–17.
- T**
- Takahashi, K., Gbatei, M. A., Lam, H. C., O'Halloran, D. J. and Bloom, S. R. (1990). Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia* **33**, 306–310.
- Tan, A. L. Y., Forbes, J. M. and Cooper, M. E. (2007). AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Semin. Nephrol.* **27**, 130–143.
- Tan, F., Ghosh, S., Mosunjac, M., Mancini, E. and Ofori-Acquah, S. F. (2016). Original Research: Diametric effects of hypoxia on pathophysiology of sickle cell disease in a murine model. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **241**, 766–771.
- Tauler, P., Aguiló, A., Gimeno, I., Fuentespina, E., Tur, J. A. and Pons, A. (2006). Response of blood cell antioxidant enzyme defences to antioxidant diet supplementation and to intense exercise. *Eur. J. Nutr.* **45**, 187–195.

- Taylor, R. S., Brown, A., Ebrahim, S., Jolliffe, J., Noorani, H., Rees, K., Skidmore, B., Stone, J. A., Thompson, D. R. and Oldridge, N. (2004). Exercise-based rehabilitation for patients with coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Med.* **116**, 682–692.
- Teillet, T., Pilardeau, P., Libercier, P., Vaysse, J. and Hermant, J. (1991). Variations des protéines plasmatiques pendant un exercice de courte durée. *Sci. Sports* **6**, 173–178.
- Teixeira-Lemos, E., Nunes, S., Teixeira, F. and Reis, F. (2011). Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Cardiovasc. Diabetol.* **10**, 12.
- Thiriet, P., Le Hesran, J. Y., Wouassi, D., Bitanga, E., Gozal, D. and Louis, F. J. (1994). Sick cell trait performance in a prolonged race at high altitude. *Med. Sci. Sports Exerc.* **26**, 914–918.
- Thorin, E. and Webb, D. J. (2010). Endothelium-derived endothelin-1. *Pflugers Arch.* **459**, 951–958.
- Thornalley, P. J., McLellan, A. C., Lo, T. W., Benn, J. and Sönksen, P. H. (1996). Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **1979** **91**, 575–582.
- Tinti, G., Somera, R., Valente, F. M. and Domingos, C. R. B. (2010). Benefits of kinesiotherapy and aquatic rehabilitation on sickle cell anemia. A case report. *Genet. Mol. Res. GMR* **9**, 360–364.
- Tolosano, E. and Altruda, F. (2002). Hemopexin: Structure, Function, and Regulation. *DNA Cell Biol.* **21**, 297–306.
- Tozzi-Ciancarelli, M. G., Penco, M. and Di Massimo, C. (2002). Influence of acute exercise on human platelet responsiveness: possible involvement of exercise-induced oxidative stress. *Eur. J. Appl. Physiol.* **86**, 266–272.
- Tripette, J., Connes, P., Beltan, E., Chalabi, T., Marlin, L., Chout, R., Baskurt, O. K., Hue, O. and Hardy-Dessources, M.-D. (2010a). 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.
- Tripette, J., Connes, P., Hedreville, M., Etienne-Julan, M., Marlin, L., Hue, O. and Hardy-Dessources, M.-D. (2010b). Patterns of exercise-related inflammatory response in sickle cell trait carriers. *Br. J. Sports Med.* **44**, 232–237.
- Tripette, J., Hardy-Dessources, M.-D., Romana, M., Hue, O., Diaw, M., Samb, A., Diop, S. and Connes, P. (2013). Exercise-related complications in sickle cell trait. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **55**, 29–37.
- Trudel, M., Saadane, N., Garel, M. C., Bardakdjian-Michau, J., Blouquit, Y., Guerquin-Kern, J. L., Rouyer-Fessard, P., Vidaud, D., Pachnis, A. and Roméo, P. H. (1991). Towards a transgenic mouse model of sickle cell disease: hemoglobin SAD. *EMBO J.* **10**, 3157–3165.
- Trudel, M., Paepe, M. D., Chretien, N., Saadane, N., Jacmain, J., Sorette, M., Hoang, T. and Beuzard, Y. (1994). Sickle cell disease of transgenic SAD mice. *Blood* **84**, 3189–3197.
- Tsironi, M. and Aessopos, A. (2005). The heart in sickle cell disease. *Acta Cardiol.* **60**, 589–598.

U

Urso, M. L. and Clarkson, P. M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* **189**, 41–54.

Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P. and Mahajan, R. (2009). Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr. Neuropharmacol.* **7**, 65–74.

V

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**, 1–40.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M. and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44–84.

van Beaumont, W., Underkofler, S. and van Beaumont, S. (1981). Erythrocyte volume, plasma volume, and acid-base changes in exercise and heat dehydration. *J. Appl. Physiol.* **50**, 1255–1262.

van Beers, E. J., van der Plas, M. N., Nur, E., Bogaard, H.-J., van Steenwijk, R. P., Biemond, B. J. and Bresser, P. (2014). Exercise tolerance, lung function abnormalities, anemia, and cardiothoracic ratio in sickle cell patients. *Am. J. Hematol.* **89**, 819–824.

Veiga, P. C., Schroth, R. J., Guedes, R., Freire, S. M. and Nogueira-Filho, G. (2013). Serum cytokine profile among Brazilian children of African descent with periodontal inflammation and sickle cell anaemia. *Arch. Oral Biol.* **58**, 505–510.

Verduzco, L. A. and Nathan, D. G. (2009). Sickle cell disease and stroke. *Blood* **114**, 5117–5125.

Vichinsky, E. P., Styles, L. A., Colangelo, L. H., Wright, E. C., Castro, O., Nickerson, B. and Disease, the C. S. of S. C. (1997). Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease: Clinical Presentation and Course. *Blood* **89**, 1787–1792.

Vichinsky, E. P., Neumayr, L. D., Earles, A. N., Williams, R., Lennette, E. T., Dean, D., Nickerson, B., Orringer, E., McKie, V., Bellevue, R., et al. (2000). Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1855–1865.

Viguie, C. A., Frei, B., Shigenaga, M. K., Ames, B. N., Packer, L. and Brooks, G. A. (1993). Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **75**, 566–572.

Vincent, L., Féasson, L., Oyono-Enguélé, S., Banimbek, V., Denis, C., Guarneri, C., Aufradet, E., Monchanin, G., Martin, C., Gozal, D., et al. (2010). Remodeling of skeletal muscle microvasculature in sickle cell trait and α -thalassemia. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **298**, H375–H384.

Vlassara, H. (1996). Advanced Glycation End-products and Atherosclerosis. *Ann. Med.* **28**, 419–426.

Vollaard, N. B. J., Shearman, J. P. and Cooper, C. E. (2005). Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med. Auckl. NZ* **35**, 1045–1062.

W

Walter, P. B., Fung, E. B., Killilea, D. W., Jiang, Q., Hudes, M., Madden, J., Porter, J., Evans, P., Vichinsky, E. and Harmatz, P. (2006). Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with β -thalassaemia or sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* **135**, 254–263.

Waltz, X., Hedreville, M., Sinnapah, S., Lamarre, Y., Soter, V., Lemonne, N., Etienne-Julan, M., Beltan, E., Chalabi, T., Chout, R., et al. (2012). Delayed beneficial effect of acute exercise on red blood cell aggregate strength in patients with sickle cell anemia. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **52**, 15–26.

Wang, J.-S., Li, Y.-S., Chen, J.-C. and Chen, Y.-W. (2005). Effects of Exercise Training and Deconditioning on Platelet Aggregation Induced by Alternating Shear Stress in Men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 454–460.

Ware, R. E., Davis, B. R., Schultz, W. H., Brown, R. C., Aygun, B., Sarnaik, S., Odame, I., Fuh, B., George, A., Owen, W., et al. (2016). Hydroxycarbamide versus chronic transfusion for maintenance of transcranial doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia—TCD With Transfusions Changing to Hydroxyurea (TWITCH): a multicentre, open-label, phase 3, non-inferiority trial. *The Lancet* **387**, 661–670.

Waring, W. S., Convery, A., Mishra, V., Shenkin, A., Webb, D. J. and Maxwell, S. R. J. (2003). Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *Clin. Sci.* **105**, 425–430.

Watson, T. A., Callister, R., Taylor, R. D., Sibbritt, D. W., MacDonald-Wicks, L. K. and Garg, M. L. (2005). Antioxidant restriction and oxidative stress in short-duration exhaustive exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **37**, 63–71.

Wautier, M.-P., Chappey, O., Corda, S., Stern, D. M., Schmidt, A. M. and Wautier, J.-L. (2001). Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **280**, E685–E694.

Weiner HL (2004). Multiple sclerosis is an inflammatory t-cell-mediated autoimmune disease. *Arch. Neurol.* **61**, 1613–1615.

Westerman, M. p., Green, D., Gilman-Sachs, A., Beaman, K., Freels, S., Boggio, L., Allen, S., Schlegel, R. and Williamson, P. (2002). Coagulation changes in individuals with sickle cell trait. *Am. J. Hematol.* **69**, 89–94.

Willen, S. M., Thornburg, C. D. and Lantos, P. M. (2014). Travelers With Sickle Cell Disease. *J. Travel Med.* **21**, 332–339.

Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Khoa, T. N., Capeillère-Blandin, C., Nguyen, A. T., Canteloup, S., Dayer, J.-M., Jungers, P., Drüeke, T. and Descamps-Latscha, B. (1998). Advanced Oxidation Protein Products as Novel Mediators of Inflammation and Monocyte Activation in Chronic Renal Failure^{1, 2}. *J. Immunol.* **161**, 2524–2532.

Wood, K. C. and Granger, D. N. (2007). Sickle Cell Disease: Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Metabolites. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34**, 926–932.

- Wood, K. C., Hebbel, R. P., Lefer, D. J. and Granger, D. N.** (2006). Critical role of endothelial cell-derived nitric oxide synthase in sickle cell disease-induced microvascular dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 1443–1453.
- Wood, K. C., Hsu, L. L. and Gladwin, M. T.** (2008). Sickle cell disease vasculopathy: A state of nitric oxide resistance. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1506–1528.
- Wu, Y., Tibrewal, N. and Birge, R. B.** (2006a). Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends Cell Biol.* **16**, 189–197.
- Wu, L.-C., Sun, C.-W., Ryan, T. M., Pawlik, K. M., Ren, J. and Townes, T. M.** (2006b). Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells. *Blood* **108**, 1183–1188.
- Wyatt, H. L. and Mitchell, J.** (1978). Influences of physical conditioning and deconditioning on coronary vasculature of dogs. *J. Appl. Physiol.* **45**, 619–625.

X

- Xie, J., Méndez, J. D., Méndez-Valenzuela, V. and Aguilar-Hernández, M. M.** (2013). Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cell. Signal.* **25**, 2185–2197.
- Xu, B., Chibber, R., Ruggiero, D., Kohner, E., Ritter, J. and Ferro, A.** (2003). Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *FASEB J.*
- Xu, H., Wandersee, N. J., Guo, Y., Jones, D. W., Holzhauer, S. L., Hanson, M. S., Machogu, E., Brousseau, D. C., Hogg, N., Densmore, J. C., et al.** (2014). Sickle cell disease increases high mobility group box 1: a novel mechanism of inflammation. *Blood* **124**, 3978–3981.

Y

- Yan, S. D., Schmidt, A. M., Anderson, G. M., Zhang, J., Brett, J., Zou, Y. S., Pinsky, D. and Stern, D.** (1994). Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 9889–9897.
- Yang, A.-L. and Chen, H.-I.** (2003). Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. *Atherosclerosis* **169**, 11–17.
- Yeligar, S. M., Machida, K. and Kalra, V. K.** (2010). Ethanol-induced HO-1 and NQO1 Are Differentially Regulated by HIF-1 α and Nrf2 to Attenuate Inflammatory Cytokine Expression. *J. Biol. Chem.* **285**, 35359–35373.

Z

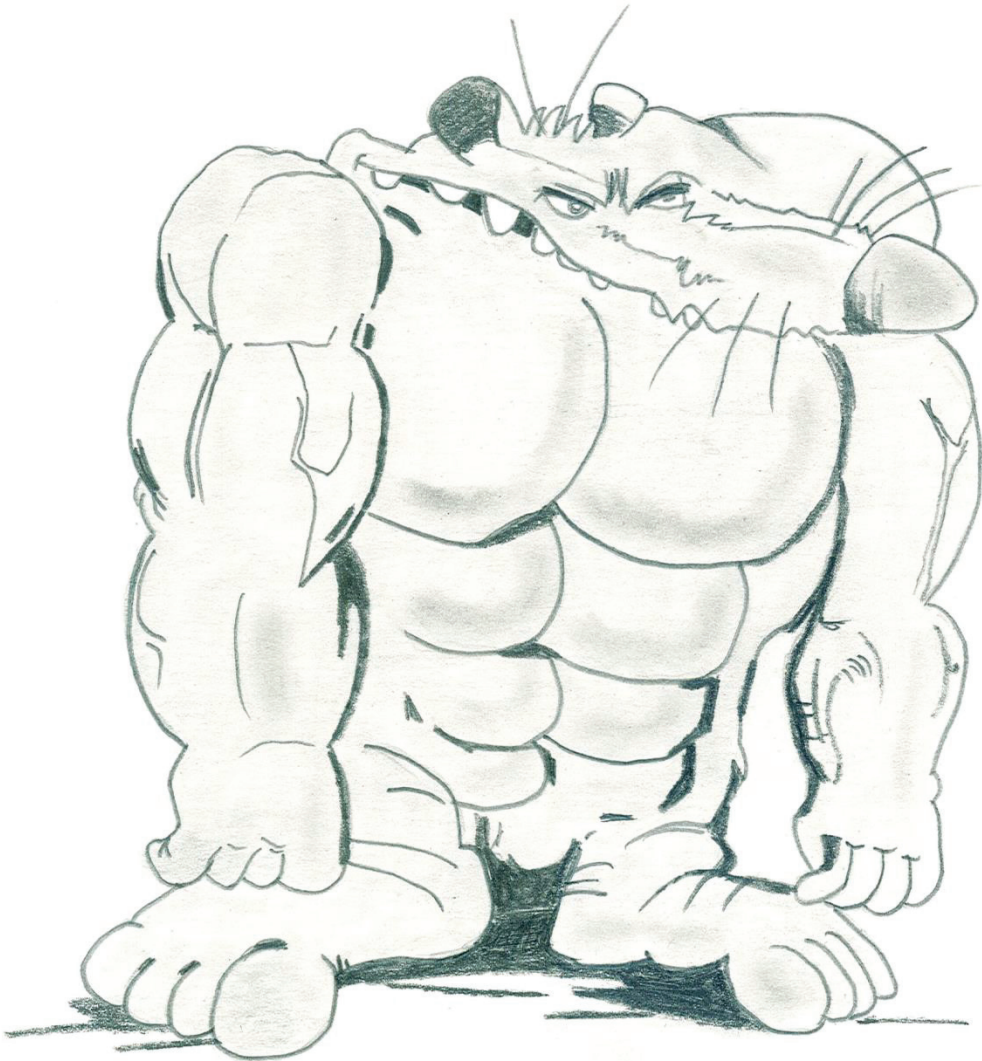
- Zaldivar, F., Wang-Rodriguez, J., Nemet, D., Schwindt, C., Galassetti, P., Mills, P. J., Wilson, L. D. and Cooper, D. M.** (2006). Constitutive pro- and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. *J. Appl. Physiol.* **100**, 1124–1133.

- Zelko, I. N., Mariani, T. J. and Folz, R. J.** (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 337–349.
- Zhang, M., Kho, A. L., Anilkumar, N., Chibber, R., Pagano, P. J., Shah, A. M. and Cave, A. C.** (2006). Glycated Proteins Stimulate Reactive Oxygen Species Production in Cardiac Myocytes Involvement of Nox2 (gp91phox)-Containing NADPH Oxidase. *Circulation* **113**, 1235–1243.
- Zhou, L. L., Cao, W., Xie, C., Tian, J., Zhou, Z., Zhou, Q., Zhu, P., Li, A., Liu, Y., Miyata, T., et al.** (2012). The receptor of advanced glycation end products plays a central role in advanced oxidation protein products-induced podocyte apoptosis. *Kidney Int.* **82**, 759–770.
- Zoppini, G., Targher, G., Zamboni, C., Venturi, C., Cacciatori, V., Moghetti, P. and Muggeo, M.** (2006). 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**, 543–549.
- Zou, M.-H., Shi, C. and Cohen, R. A.** (2002). High Glucose via Peroxynitrite Causes Tyrosine Nitration and Inactivation of Prostacyclin Synthase That Is Associated With Thromboxane/Prostaglandin H2 Receptor–Mediated Apoptosis and Adhesion Molecule Expression in Cultured Human Aortic Endothelial Cells. *Diabetes* **51**, 198–203.

PARTIE 6

-

valorisation



I. PublicationsPUBLICATIONS RÉFÉRENCÉES DANS PUBMED

2015-3. Martin C, Pialoux V, Faes C, **Charrin E**, Skinner S, Connes P. Does Physical Activity Increase or Decrease the Risk of Sickle Cell Disease Complications? **Br J Sports Med.** bjsports-2015-095317. [IF₂₀₁₅=6.724]

2015-2. Faes C, **Charrin E**, Connes P, Pialoux V, Martin C. Chronic physical activity limits blood rheology alterations in transgenic SAD mice. **Am J Hematol.** 90(2):E32-3.[IF₂₀₁₅=5.0]

2015-1. **Charrin E**, Aufradet E, Douillard A, Romdhani A, De Souza G, Bessaad A, Faes C, Chirico EN, Pialoux V, Martin C. Oxidative stress is decreased in physically active sickle cell SAD mice. **Br J Haematol.** 168(5):747-56. [IF₂₀₁₅]=5.401

2014-1. Aufradet E, Douillard A, **Charrin E**, Romdhani A, De Souza G, Bessaad A, Faes C, Bourgeaux V, Chirico EN, Canet-Soulas E, Pialoux V, Martin C. Physical activity limits pulmonary endothelial activation in sickle cell SAD mice. **Blood.** 123(17):2745-7. [IF₂₀₁₄=10.452]

ARTICLES SOUMIS

2016-2. **Charrin E**, Dubé JJ, Connes P, Pialoux V, Ghosh S, Ofori-Acquah SF*, Martin C*. Moderate exercise training decreases inflammation in Townes sickle cell mice. **Br J Haematol.**

2016-1. **Charrin E**, Ofori-Acquah SF, Nader E, Skinner S, Connes P, Pialoux V, Joly P, Martin C. Inflammatory and oxidative stress phenotypes in transgenic Townes sickle cell mice. **Blood Cell Mol Dis.** *En révision*

ARTICLE EN RÉDACTION

2016. **Charrin E**, Faes C, Pialoux V, Connes P, Joly P, Martin C. Effects of RAGE blockade on inflammation, oxidative stress and nitric oxide metabolism in transgenic Townes sickle mice.

ABSTRACT DE CONFÉRENCE

2015. **Charrin E**, Martin C, Dubé JJ, Connes P, Pialoux V, Ofori-Acquah SF. 976 Moderate exercise training attenuates inflammation in transgenic sickle cell mice. American Society of Hematology

II. CommunicationsCOMMUNICATIONS AFFICHÉES

Charrin E, Ofori-Acquah S, Dube J, Connes P, Pialoux V, Martin C. L'entraînement à intensité modérée atténue l'inflammation chez le modèle de souris drépanocytaires Townes.

36^{ème} Congrès de la Société Française d'Hématologie. **Paris**. 23-25 Mars 2016.



Charrin E, Martin C, Dube J, Connes Philippe, Pialoux V, Ofori-Acquah S. Moderate exercise training attenuates inflammation in transgenic sickle cell mice.

57th American Society of Hematology Annual Meeting. **Orlando, FL, USA**. 5-8 Décembre 2015



Charlot K, Faes C, **Charrin E**, Moeckesch B, Petras M, Aufradet E, Doumido L, Etienne-Julan L, Antoine S, Waltz X, Hardy-Dessources MD, Romana M, Pialoux V, Martin C, Connes P. Should we promote regular physical activity in sickle cell patients?

16^{ème} Congrès International de l'ACAPS, **Nantes**. 26-28 Octobre 2015.



Charrin E, Ofori-Acquah S, Faes C, Connes P, Pialoux V, Martin C. Effets anti-inflammatoires d'un entraînement à intensité modérée chez des souris drépanocytaires Townes.

Congrès du Club du Globule Rouge et du Fer, **Arcachon**. 24-25 septembre 2015.



Faes C, **Charrin E**, Aufradet E, Martin C, Pialoux V. Hypoxie/réoxygénation et statut redox rénal : implication du facteur de transcription nrf2 chez un modèle murin transgénique drépanocytaire ?

Congrès du Club du Globule Rouge et du Fer, **Arcachon**. 24-25 Septembre 2015.



Faes C, Aufradet E, **Charrin E**, Connes P, Pialoux V, Martin C. Chronic physical activity in transgenic SAD mice: effects on blood rheology parameters and oxidative stress.

American College of Sports Medicine Annual Meeting, **San Diego, CA, USA**. 26-30 Mai 2015.



 COMMUNICATIONS ORALES

Charrin E, Faes C, Connes P, Pialoux V, Martin C. Effects of RAGE blockade on inflammation, oxidative stress and nitric oxide bioavailability in transgenic sickle mice.

18th Conference of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation. Lisbonne, PORTUGAL. 5-8 Juin 2016.



Charrin E, Ofori-Acquah S, Dube J, Faes C, Connes P, Pialoux V, Martin C. Moderate exercise training blunts inflammation in severe transgenic sickle cell mice.

18th Conference of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation. Lisbonne, PORTUGAL. 5-8 Juin 2016.



Charrin E, Ofori-Acquah S, Faes C, Connes P, Pialoux V et Martin C. Effets anti-inflammatoires d'un entraînement à intensité modérée chez des souris drépanocytaires Townes.

20ème Journée de l'EDISS. Lyon. 18 Octobre 2015.



Connes P, Faes C, Charlot K, **Charrin E**, Petras M, Aufradet E, Doumdo L, Etienne-Julan M, Waltz X, Hardy-Dessources MD, Romana M, Pialoux V and Martin C. Should we promote regular physical activity in sickle cell patients?

15th international congress of biorheology and 8th international conference on clinical hemorheology, Seoul, CORÉE. 24-28 Mai 2015.



Charrin E, Romdhani A, Aufradet E, Pialoux V, Martin C. Effects of physical activity on oxidative stress and vascular adhesion modulators after a hypoxia/reoxygenation stress in sickle SAD mice.

9th European congress on sickle cell disease, Strasbourg. 6-8 mars 2014.



PARTIE 7

-

Annexes



Annexe 1

L'activité physique limite l'activation endothéliale pulmonaire chez des souris transgéniques drépanocytaires SAD

Aufradet E., Douillard A., **Charrin E.**, Romdhani A., De Souza G., Bessaad A., Faes C.,
Bourgeaux V., Chirico E.N., Canet-Soulas E., Pialoux V., Martin C.

Publiée dans *Blood* en 2014 123(17) : 2745-2747

deletions and result in a frameshift into the alternative reading frame 1. Familial predisposition to MPNs also frequently leads to somatic *JAK2-V617F* mutations that are found in the majority of the affected family members.⁵ Because polycythemia vera (PV), ET, and PMF phenotypes can be observed in these pedigrees, we tested whether mutations in *CALR* also occur in familial MPNs.

We studied 12 pedigrees with familial MPNs in which at least 1 affected family member carried a somatic *JAK2-V617F* mutation, and we also examined 11 pedigrees with hereditary thrombocytosis (HT), in which we excluded mutations in the *THPO*, *MPL*, and *JAK2* genes (data not shown). We found a *CALR* mutation in 3 of the 12 familial MPN pedigrees (Figure 1A). In each of these 3 pedigrees, 1 affected family member carried a 52-base deletion in exon 9 of the *CALR* gene (not shown), which represents the most frequent form of the *CALR* mutations (type 1). One of these patients was initially diagnosed with ET⁷ and later progressed to PMF (MPN family 1), and the two remaining patients had ET (MPN families 2 and 3). All *CALR* mutations occurred in patients with an MPN diagnosis, whereas a somatic *JAK2-V617F* mutation was found in 1 healthy family member with platelets in the upper normal range but otherwise normal blood counts (MPN family 5; data not shown). A similar finding was reported previously.⁸ We did not detect *CALR* mutations in any of the 11 families with HT and a total of 44 affected and family members (Figure 1B).

In the 12 pedigrees with familial MPNs, all affected family members carried either a somatic *JAK2-V617F* mutation or a mutation in *CALR*. In MPN family 1, the underlying predisposition is inherited as an autosomal dominant trait with low penetrance (Figure 1A), whereas in other pedigrees, the mode of transmission is more difficult to determine because too few family members in too few generations were available (eg, MPN families 2 and 3). Two mechanistic models have been proposed regarding how such a germline predisposition may result in MPNs with clonal hematopoiesis.^{9,10} First, the germline mutation could increase the mutation rate in *JAK2* and *CALR* genes (hypermutability hypothesis), or second, it could synergize with *JAK2-V617F* or *CALR* in MPN disease initiation (fertile ground hypothesis). Because the G>T transversion in *JAK2-V617F* and the 52-base deletion in *CALR* are mechanistically very different, it seems unlikely that they could be promoted by the same germline mutation through a hypermutability mechanism. Therefore, our findings favor the fertile ground hypothesis of germline predisposition to MPN.

Pontus Lundberg

*Experimental Hematology, Department of Biomedicine,
University Hospital Basel,
Basel, Switzerland*

Ronny Nienhold

*Experimental Hematology, Department of Biomedicine,
University Hospital Basel,
Basel, Switzerland*

Achille Ambrosetti

*Section of Hematology, Department of Medicine,
University of Verona,
Verona, Italy*

Francisco Cervantes

*Hospital Clínic,
Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer,
Barcelona, Spain*

Manuel M. Pérez-Encinas

*Servicio de Hematología,
Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela,
Santiago de Compostela, Spain*

Radek C. Skoda

*Experimental Hematology, Department of Biomedicine,
University Hospital Basel,
Basel, Switzerland*

Acknowledgments: This work was supported by grants 310000-120724/1 and 32003BB_135712/1 from the Swiss National Science Foundation and KLS-02398-02-2009 from the Swiss Cancer League (R.C.S.).

Contribution: P.L. designed and performed research, analyzed data, and wrote the paper; R.N. performed research and analyzed data; A.A., F.C., and M.M.P.-E. provided clinical data and patient samples and analyzed results; and R.C.S. designed research, analyzed data, and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Radek C. Skoda, Department of Biomedicine, Experimental Hematology, University Hospital Basel, Hebelstrasse 20, 4031 Basel, Switzerland; e-mail: radek.skoda@unibas.ch.

References

- Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;112(6):2190-2198.
- Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(7):1723-1735.
- Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2379-2390.
- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated *JAK2*. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2391-2405.
- Bellanné-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe *JAK2* mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;108(1):346-352.
- Kralovics R, Teo SS, Li S, et al. Acquisition of the V617F mutation of *JAK2* is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;108(4):1377-1380.
- Pérez-Encinas M, Bello JL, Pérez-Crespo S, De Miguel R, Tome S. Familial myeloproliferative syndrome. *Am J Hematol*. 1994;46(3):225-229.
- Bellanné-Chantelot C, Jego P, Lionne-Huyghe P, Tulliez M, Najman A; French group on myeloproliferative disorders. The *JAK2(V617F)* mutation may be present several years before the occurrence of overt myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 2008;22(2):450-451.
- Skoda RC. Hereditary myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2010;95(1):6-8.
- Jones AV, Cross NC. Inherited predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Ther Adv Hematol*. 2013;4(4):237-253.

© 2014 by The American Society of Hematology

To the editor:

Physical activity limits pulmonary endothelial activation in sickle cell SAD mice

Vaso-occlusion (VOC) in sickle cell disease (SCD) results from many pathophysiological mechanisms including sickling of red blood cells, hemolysis, inflammation, vascular adhesion, and reduced nitric oxide (NO) bioavailability.¹ All these mechanisms interact

together to trap blood cells and to accentuate the local blood flow decrease and subsequent local hypoxia.

In healthy and pathological conditions, physical training results in physiological and molecular adaptations including anti-inflammatory

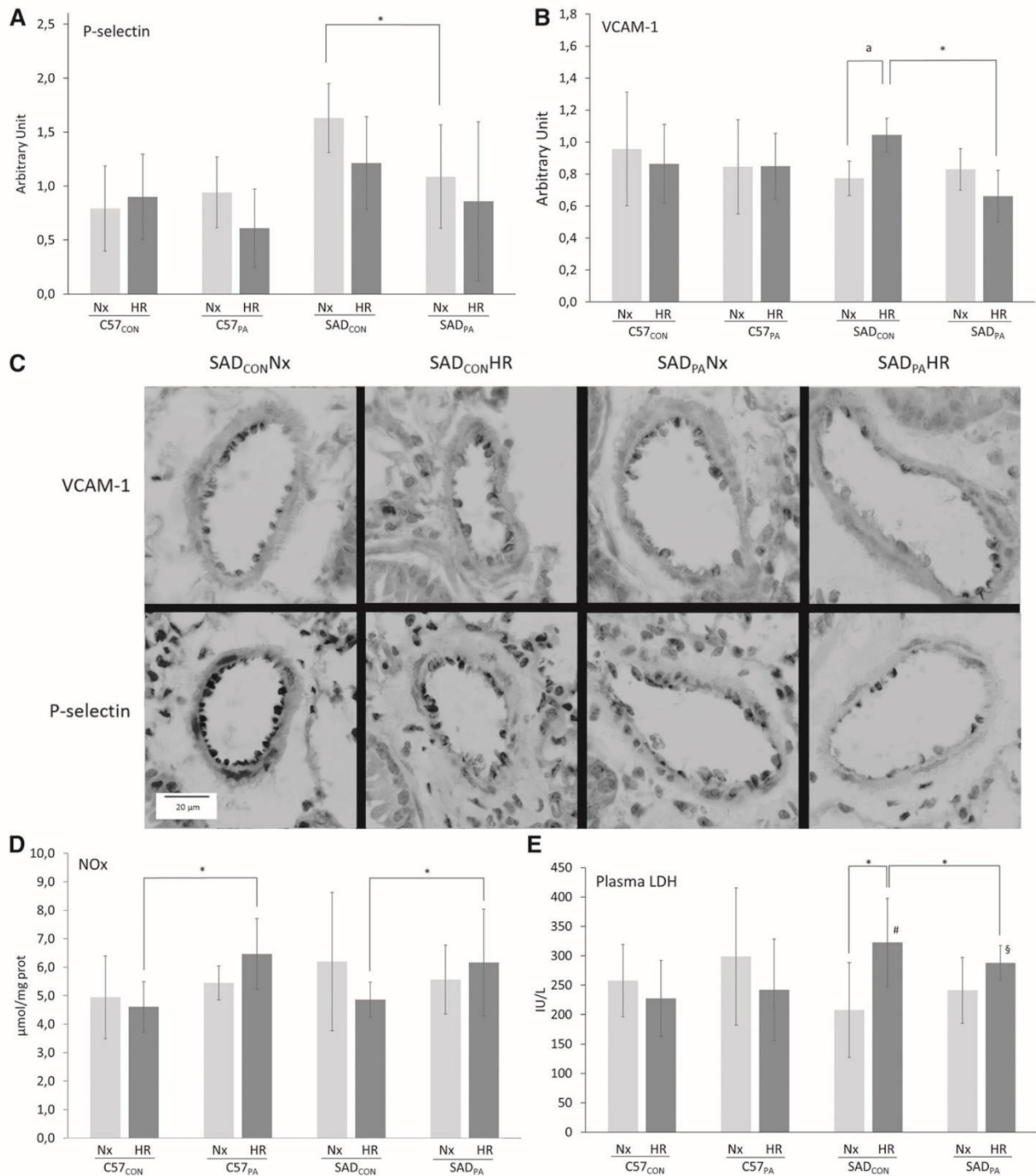


Figure 1. Effect of HR stress in PA or CON C57Bl/6 (C57; $n = 7$ per group) and SAD mice ($n = 6$ per group). Eight weeks of a voluntary wheel-running protocol were conducted in C57 and SCD SAD mice. Before euthanizing the animals, HR stress (4 hours hypoxic stress at 6.5% oxygen followed by 2 hours of reoxygenation in ambient air) was used to stimulate the pathophysiological parameters known to trigger the VOC in this mouse model. (A) P-selectin and (B) VCAM-1 immunostaining scores in the lung. Immunohistologic slides were blindly semiquantified by 3 experienced anatomists for VCAM-1 and P-selectin with the staining intensity. For each vessel (15 to 20 vessels per mouse), a score from 0 to 3 was attributed (0, no immunostaining; 1, <25% vessel staining; 2, <50% vessel staining; 3, >50% vessel staining). For each mouse, the immunostaining score was the mean of each vessel score from a section. (C) Representative staining for VCAM-1 and P-selectin in the blood vessel of lungs. Magnification $\times 40$. (D) Nitrite/nitrate (NOx) concentrations in the lungs. The Griess method was used: the sum of nitrite and nitrate in the plasma is considered an index of NO production. (E) Plasma concentrations of lactate dehydrogenase (LDH). * $P < .05$; #, $P < .05$ vs C57_{CON}HR; §, $P < .05$ vs C57_{PA}HR; a, $P = .07$. Values are means \pm standard deviation. All variables were tested for normality and variance homogeneity. P-selectin immunostaining and NOx concentrations were tested with nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney U test. The other variables were compared using factorial analysis of variance followed by planned comparisons. Nx, normoxic conditions.

effects and endothelial activation limitations.² In SCD, these adaptations could be beneficial by limiting physiological factors involved in the VOC. In previous studies, we demonstrated that physical training blunted plasma soluble vascular cell adhesion-1 (VCAM-1)³ and improved NO bioavailability in sickle cell trait carriers.⁴ The present study investigated the effects of chronic physical activity at baseline and in response to a VOC stress in the lungs of sickle SAD mice.

Healthy (C57Bl/6J) and SAD male mice were used in this study. The SAD transgene reproduces the hypoxia-induced vaso-occlusive events of human SCD.⁵ Control mice (CON) lived in standard mouse cages, whereas physical activity mice (PA) were housed in cages equipped with running wheels. After 8 weeks, mice were euthanized either after normoxic conditions or after exposure to an acute 4 hours of vaso-occlusive hypoxic stress followed by 2 hours of reoxygenation in ambient air (HR).

Interestingly, baseline P-selectin expression in the lungs (Figure 1A,C) was more evident in SAD_{CON} than in SAD_{PA} mice. Because P-selectin is involved in leukocytes and sickle cells trapping initiation, this decreased expression with physical activity may lead to a beneficial reduction in cell aggregate formation and consequently the risk of VOC. Contrary to SAD_{CON} mice, the expression of the adhesion molecule VCAM-1 in the PA group was not increased by HR stress (Figure 1B), suggesting that physical activity could limit pulmonary endothelial activation.

Endothelial activation has been shown to be notably mediated by decreased NO bioavailability. After HR stress, higher concentrations of NOx were measured in the lungs of SAD_{PA} compared with SAD_{CON} (+63%, Figure 1D). These results strongly suggest that physical activity could improve pulmonary endothelial function, as already observed in healthy subjects.⁶ This improvement of NO metabolism may also participate in the decreased VCAM-1 expression observed after HR, via nuclear factor κ B inhibition.⁷ Hemolysis is also known to trigger endothelial activation and vasculopathy.⁸ After HR, plasma LDH concentrations increased only in SAD_{CON} mice, whereas no significant variation was observed in the SAD_{PA} group, suggesting that PA could limit HR-induced hemolysis in SAD mice.

In conclusion, this study is the first to demonstrate the beneficial effects of physical activity in response to an HR stress in SCD mice. Similar exercise programs could be a relevant option to prevent pulmonary complications in SCD patients because it has been observed in SCD subjects that moderate acute exercise does not alter their hemorheologic, oxidative stress, or hematologic parameters.^{9,10} From these results, further studies performed on more severe SCD mice models and in SCD patients will have to confirm the efficiency and/or the benefits of PA in SCD, and to describe the underlying mechanisms of the therapeutic effect of exercise training in SCD.

Emeline Aufradet

EA 647, Center of Research and Innovation on Sports, University of Lyon, Lyon, France

Aymeric Douillard

EA 647, Center of Research and Innovation on Sports, University of Lyon, Lyon, France

Emmanuelle Charrin

EA 647, Center of Research and Innovation on Sports, University of Lyon, Lyon, France

Aymen Romdhani

EA 647, Center of Research and Innovation on Sports, University of Lyon, Lyon, France

Genevieve De Souza

EA 647, Center of Research and Innovation on Sports, University of Lyon, Lyon, France

Amine Bessaad

EA 647, Center of Research and Innovation on Sports, University of Lyon, Lyon, France

Camille Faes

EA 647, Center of Research and Innovation on Sports, University of Lyon, Lyon, France

Vanessa Bourgeaux

ERYTECH Pharma, Lyon, France

Erica N. Chirico

EA 647, Center of Research and Innovation on Sports, University of Lyon, Lyon, France
INSERM U1060, Laboratory CarMeN, University of Lyon, Lyon, France

Emmanuelle Canet-Soulas

INSERM U1060, Laboratory CarMeN, University of Lyon, Lyon, France

Vincent Pialoux

EA 647, Center of Research and Innovation on Sports, University of Lyon, Lyon, France

Cyril Martin

EA 647, Center of Research and Innovation on Sports, University of Lyon, Lyon, France

Acknowledgments: The authors thank Pr Y. Beuzard (INSERM U733, Paris, France) for providing initial SAD breeding pairs, which allowed our laboratory to develop a SAD colony; Y. Campion, A. Dorier, and E. Lemaire for technical assistance; and the French Society of Hematology for financial support.

Contribution: E.A., E.C.-S., V.P., and C.M. participated in the design of the study; E.A., A.D., A.R., E.C., G.D.S., A.B., C.F., and V.B. performed the experiments; E.A. and C.M. wrote the manuscript; and E.N.C., E.C.-S., and V.P. revised the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Cyril Martin, Center of Research and Innovation on Sports (CRIS EA 647), 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.

References

- Conran N, Costa FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clin Biochem*. 2009;42(18):1824-1838.
- 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):791-797.
- Aufradet E, Monchanin G, Oyonno-Engelle S, et al. Habitual physical activity and endothelial activation in sickle cell trait carriers. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42(11):1987-1994.
- Chirico EN, Martin C, Faès C, et al. Exercise training blunts oxidative stress in sickle cell trait carriers. *J Appl Physiol*. 2012;112(9):1445-1453.
- Trudel M, De Paepe ME, Chrétien N, et al. Sickle cell disease of transgenic SAD mice. *Blood*. 1994;84(9):3189-3197.
- Green DJ, Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol*. 2004;561(pt 1):1-25.
- Aslan M, Freeman BA. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(11):1469-1483.
- Kato GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, Gladwin MT. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *Am J Hematol*. 2009;84(9):618-625.
- Balayssac-Siransy E, Connes P, Tuo N, et al. Mild haemorrhological changes induced by a moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2011;154(3):398-407.
- Faes C, Balayssac-Siransy E, Connes P, et al. Moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia: effects on oxidative stress and endothelial activation. *Br J Haematol*. 2014;164(1):124-130.

Annexe 2

L'activité physique régulière limite les altérations de la rhéologie sanguine chez des souris transgéniques SAD

Faes C., **Charrin E.**, Connes P., Pialoux V., Martin C.

Publiée dans *Am J Hematol* en 2015 90(2) : E32-3

*Correspondence to: Philippe Connes, UMR Inserm U1134, Université des Antilles et de la Guyane, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France. E-mail: pconnes@yahoo.fr
German Research Foundation, Region Guadeloupe
Received for publication: 30 October 2014; Accepted: 3 November 2014
Published online: 7 November 2014 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com)
DOI: 10.1002/ajh.23894

References

- Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 2006;107:2943–2951.
- Grau M, Pauly S, Ali J, et al. RBC-NOS-dependent S-nitrosylation of cytoskeletal proteins improves RBC deformability. *PLoS One* 2013;8:e56759.
- Simmonds MJ, Detterich JA, Connes P. Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell. *Biorheology* 2014;51:121–134.
- Grau M, Mozar A, Charlot K, et al. High red blood cell nitric oxide synthase activation is not associated with improved vascular function and red blood cell deformability in sickle cell anemia. *Br J Haematol*, in press.
- Hierso R, Waltz X, Mora P, et al. Effects of oxidative stress on red blood cell rheology in sickle cell patients. *Br J Haematol* 2014;166:601–606.
- Lemonne N, Lamarre Y, Romana M, et al. Impaired blood rheology plays a role in the chronic disorders associated with sickle cell-hemoglobin C disease. *Haematologica* 2014;99:74–75.

Chronic physical activity limits blood rheology alterations in transgenic SAD mice

To the Editor:

Hemorheological abnormalities, including increased blood viscosity, are involved in the pathophysiology of sickle cell anemia (SCA) by triggering acute painful vaso-occlusive

events. As for cardiac, metabolic or pulmonary diseases, individualized chronic exercise programs have been suggested to improve the health status in SCA [1] but no study until now tested this hypothesis in humans because of the vaso-occlusive risks that SCA patients could encounter during such a protocol. This study examined the effects of a voluntary wheel physical activity program in transgenic mice which express the human hemoglobin SAD transgene ($\alpha 2$ human $\beta 2$ SAD) containing three sickle mutations: D-punjab ($\beta 121$ Gln), Antilles ($\beta 231$ Ile) and βS ($\beta 6$ Val) (SAD mice) on blood rheology parameters. We particularly focused on, the hematocrit-to-viscosity ratio (HVR), an index of tissue oxygenation which reflects the balance between blood oxygen carrying capacity (i.e., hematocrit), and blood flow resistance (i.e., blood viscosity) [2].

We used healthy C57Bl/6J (C57) and transgenic SAD mice, a murine model particularly severe in deoxygenated conditions. Each strain was randomly divided into sedentary (sed) and "physical activity" (PA) groups. At the end of the 8 weeks of protocol, mice were anesthetized and blood was collected by retro-orbital venipuncture into tubes containing ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) for hemorheological measurements [3]. While PA did not significantly change blood viscosity or HVR in C57 mice, it decreased blood viscosity and increased HVR at 18.75 s^{-1} in SAD mice. A similar trend was observed at 375 s^{-1} for blood viscosity and, although not significantly different, HVR level was numerically higher in SAD_{PA} versus SAD_{sed} at this shear rate (Fig. 1B2,C2). Surprisingly, hematocrit was increased in SAD_{PA} while it remains unchanged by PA in C57. There is no clear explanation about this difference but despite the higher hematocrit in SAD_{PA} versus SAD_{sed} mice, the former group exhibited a reduction of blood viscosity compared to their sed counterparts. Although not directly investigated, the decrease in blood viscosity in SAD_{PA} is probably attributed to changes in RBC rheological properties such as a decrease in RBC aggregation and/or an improvement of RBC deformability [4].

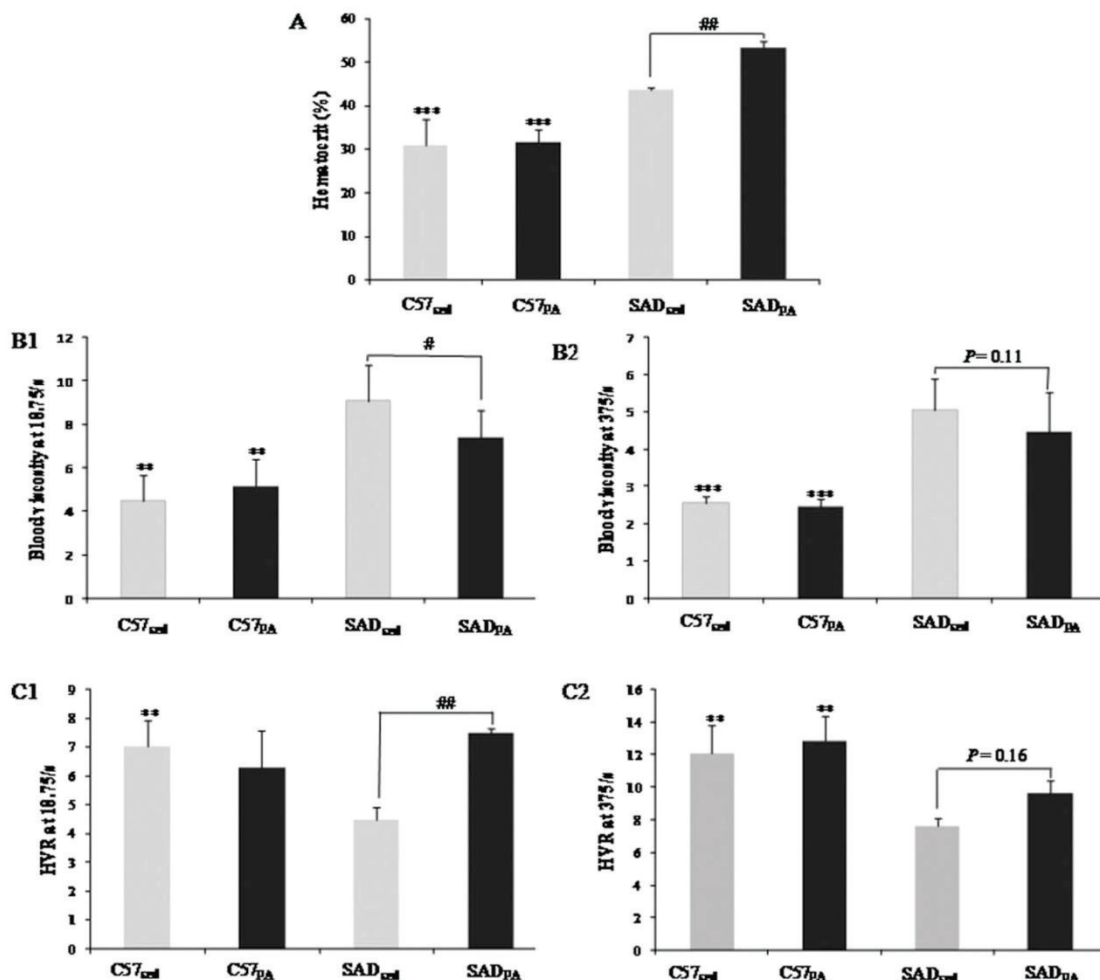


FIGURE 1. Hematocrit percentage (A), blood viscosity (B1, B2), and HVR (C1, C2) values at 18.75/s and 375/s in C57 and SAD mice (31.1 ± 3.6 weeks old) in sed (C57_{sed} [n = 6] and SAD_{sed} [n = 10]) or PA group (C57_{PA} [n = 6] and SAD_{PA} [n = 12]). Measurement of blood viscosity was performed with a cone plate viscometer (Brookfield DVII+, with CPE40 spindle) at 37°C and at two shear rates (18.75 and 375 s⁻¹) at native hematocrit. The HVR was calculated as the ratio of the native hematocrit to whole blood viscosity. **(*P* < 0.01) ***(*P* < 0.001) Significant difference compared to SAD mice; #(*P* < 0.05) ##(*P* < 0.01) Significant PA effect in SAD mice. Values are expressed as mean ± SD. All statistical analyses were conducted using Statistica (Version 8.0, StatSoft, Tulsa, OK). Hematological and hemorheological parameters were compared between SAD and C57 mice using a one-way analysis of variance followed by pairwise comparisons.

CORRESPONDENCE

In parallel, the lack of effect of PA on mean corpuscular volume (14.0 ± 0.2 vs. 14.7 ± 0.2 pg) and mean corpuscular hemoglobin concentration (31.3 ± 0.2 vs. 31.8 ± 0.1 g/dl) in SAD_{sed} versus SAD_{PA} mice suggests that RBC membrane properties have probably been affected by PA.

SAD_{PA} mice exhibited also greater WBCs count than SAD_{sed} mice (+303%, $P < 0.001$), whereas such effect of PA was not present in C57. This higher inflammatory state in SAD_{PA} mice could be related to the higher mean platelet volume (MPV) level compared to their sed counterparts (+41%, $P < 0.01$). The size of platelets represented by MPV could up-regulate inflammation [5] and WBCs count [6]. Greater inflammation in SAD_{PA} mice could be problematic by increasing the risks for vaso-occlusive events to occur. However, another recent study showed improvement of pulmonary endothelial function in trained versus sed SAD mice [7], which could counterbalance the effects of PA on WBCs count and platelet reactivity.

Thus, our findings suggest that PA, by increasing HVR and lowering blood viscosity in SAD mice could improve tissue perfusion and decrease vascular resistance, hence limiting the occurrence of vaso-occlusive crisis under stressful situations.

CAMILLE FAES,¹ EMMANUELLE CHARRIN,¹ PHILIPPE CONNES,^{1,2} VINCENT PIALOUX,^{1,2} AND CYRIL MARTIN^{1*}

¹CRIS EA 647, University Claude Bernard Lyon 1, University of Lyon, France;
²Institut Universitaire de France, Paris, France

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest

Correspondence to: Cyril Martin, Centre de Recherche et d'Innovation sur le Sport EA647, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Campus de la Doua, 69622 Villeurbanne Cedex, France. E-mail: cyril.martin@univ-lyon1.fr

Received for publication: 3 November 2014; Accepted: 4 November 2014

Published online: 10 November 2014 in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com)

DOI: 10.1002/ajh.23896

References

- Connes P, Machado R, Hue O, Reid H. Exercise limitation, exercise testing and exercise recommendations in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc* 2011;49:151–163.
- Waltz X, Hardy-Dessources MD, Lemonne N, et al. Is there a relationship between the hematocrit-to-viscosity ratio and microvascular oxygenation in brain and muscle? *Clin Hemorheol Microcirc*, in press, DOI 10.3233/CH-131742.
- Baskurt OK, Boynard M, Cokelet GC, et al. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009;42:75–97.
- Baskurt OK, Meiselman HJ. Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost* 2003;29:435–450.
- Gasparyan AY, Ayyavazyan L, Mikhailidis DP, Kitis GD. Mean platelet volume: A link between thrombosis and inflammation? *Curr Pharm Des* 2011;17:47–58.
- Steiroopoulos P, Papanas N, Nena E, et al. Mean platelet volume and platelet distribution width in patients with chronic obstructive pulmonary disease: The role of comorbidities. *Angiology* 2013;64:535–539.
- Aufradet E, Douillard A, Charrin E, et al. Physical activity limits pulmonary endothelial activation in sickle cell SAD mice. *Blood* 2014;123:2745–2747.

Annexe 3

L'activité physique augmente-elle ou diminue-t-elle le risque de complications liées à la drépanocytose ?

Martin C., Pialoux V., Faes C., **Charrin E.**, Skinner S., Connes P.

Publiée dans *Br J Sports Med* en 2015 bjsports-2015-095317

Does physical activity increase or decrease the risk of sickle cell disease complications?

Cyril Martin,^{1,2} Vincent Pialoux,^{1,2,3} Camille Faes,^{1,2} Emmanuelle Charrin,^{1,2}
Sarah Skinner,^{1,2} Philippe Connes^{1,2,3}

¹Center of Research and Innovation on Sports (CRIS EA647), Team 'Vascular Biology and Red Blood Cell', University of Lyon 1, University of Lyon, Lyon, France
²Laboratory of Excellence in Red Blood Cell (LABEX GR-Ex), PRES Sorbonne, Paris, France
³Institut Universitaire de France, Paris, France

Correspondence to
Cyril Martin, Université Claude Bernard Lyon 1, EA647 Centre de Recherche et d'Innovation sur le Sport, 27 bd du 11 Novembre 1918, Villeurbanne Cedex 69622, France; cyril.martin@univ-lyon1.fr

Accepted 14 November 2015

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is the most common inherited disease in the world. Red blood cell sickling, blood cell-endothelium adhesion, blood rheology abnormalities, intravascular haemolysis, and increased oxidative stress and inflammation contribute to the pathophysiology of SCD. Because acute intense exercise may alter these pathophysiological mechanisms, physical activity is usually contra-indicated in patients with SCD. However, recent studies in sickle-cell trait carriers and in a SCD mice model show that regular physical activity could decrease oxidative stress and inflammation, limit blood rheology alterations and increase nitric oxide metabolism. Therefore, supervised habitual physical activity may benefit patients with SCD. This article reviews the literature on the effects of acute and chronic exercise on the biological responses and clinical outcomes of patients with SCD.

The release of haemoglobin and RBC arginase into the plasma may interfere with the metabolism of nitric oxide (NO), hence reducing its bioavailability and increasing the risk of endothelial dysfunction. Concomitantly, endothelin-1 (ET-1) levels rise and increase the risks of vasoconstriction.⁴ ET-1 has also been shown to promote RBC dehydration in SCD through the activation of the Gardos channels, which may contribute to the alterations in RBC rheology and microcirculatory flow observed in SCD.⁵ Furthermore, individuals with the highest haemolytic rate have the highest number of circulating RBC microparticles,⁶ which would further impair vascular function⁷ and limit NO bioavailability.⁸ In contrast, SCD individuals with lower haemolytic rates are characterised by milder anaemia, increased blood viscosity and abnormal vascular adhesion phenomena.^{3–9} The latter occur in post-capillary venules and increase the risk of vaso-occlusive events, such as painful vaso-occlusive crisis (VOC), acute chest syndrome (ACS) and osteonecrosis.^{3–10}

Recent works suggest that alterations in blood rheology contribute differently to the two subphenotypes. A severe reduction in RBC deformability and abnormal RBC aggregation properties (ie, increased RBC aggregate strength) are associated with several complications in the first clinical phenotype, while a moderate reduction in RBC deformability and increased blood viscosity increase the risks for vaso-occlusive-like events.^{11–15}

Polymerisation of HbS by itself is not sufficient to cause vaso-occlusion. Repeated cycles of RBC sickling change the RBCs' properties and increase their adhesiveness to the vascular walls because of the membrane externalisation of phosphatidylserine.¹⁶ Enhanced inflammation, decreased NO bioavailability and increased oxidative stress change the phenotypes of the other circulating blood cells, which also exhibit increased adhesiveness.^{17–19} Immature SCD reticulocytes, mature sickled RBCs, platelets and leucocytes, may adhere to the endothelial cells and subendothelial matrix—especially in postcapillary venules where shear stress is low—and initiate vascular occlusions.^{20–21} SCD reticulocytes are characterised by the high expression of several proteins such as the $\alpha 4\beta 1$ integrin, which may interact with the vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) or the Lutheran/Basal Cell Adhesion Molecule (LU/BCAM) at the endothelial level.²² Patients with SCD are characterised by chronic inflammation as illustrated by increased pro-inflammatory mediators and leucocytosis.²³ SCD leucocytes are activated and express high levels of adhesion molecules, such as L-selectin and

INTRODUCTION: PATHOPHYSIOLOGY OF SICKLE CELL DISEASE

Sickle cell disease (SCD) is a genotypic haemoglobinopathy that affects over 50 million people worldwide.¹ This disease is caused by a single mutation resulting in the production of abnormal haemoglobin (HbS). Under deoxygenated condition, HbS polymerises, leading to the deformation of red blood cells (RBCs) into a sickle shape (RBC sickling). Sickled RBCs are fragile and poorly deformable, resulting in haemolysis and recurrent vaso-occlusion of small vessels, respectively. Vascular obstruction and/or haemolytic anaemia reduce tissue oxygen supply and are at the root of both acute and chronic clinical manifestations of SCD.

However, the clinical expression of SCD varies widely from one patient to another, as well as over time. Most complications of SCD are unpredictable. Therefore, the identification of biomarkers of risk for a given complication is an important challenge for individuals involved in the clinical management of SCD.

The last three decades of intensive basic and epidemiological work in the field of SCD have led to the recent proposition of a 'two-subphenotype' model:^{2–3} (1) the haemolytic-endothelial dysfunction phenotype and (2) the viscosity-vaso-occlusion phenotype. The two clinical/biological phenotypes overlap, but they are also characterised by several distinct complications. SCD individuals with a high haemolytic rate and severe anaemia are prone to an increased risk of vasculopathy (cerebral and pulmonary), leg ulcers, priapism and glomerulopathy.

To cite: Martin C, Pialoux V, Faes C, et al. *Br J Sports Med* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/bjsports-2015-095317

Review

$\alpha_M\beta_2$, which increase leucocyte adhesion to the vessel wall and may facilitate obstruction of the lumen.^{24–25} Moreover, activated leucocytes may form homotypic and heterotypic cell aggregates that may favour lumen occlusion.²⁵ These inflammatory abnormalities are risk factors for early SCD-related death,^{19–26} stroke²⁷ and ACS.²⁸ Pro-adhesive activity of the endothelium in patients with SCD is also manifested by the high expression of several adhesion molecules such as VCAM-1, the Intercellular Adhesion Molecule-1¹⁸ and the selectins.²⁹ Increased oxidative stress, inflammation and the presence of rigid RBCs, may damage and activate endothelial cells, leading to an over-expression of VCAM-1.³⁰ The increased adhesion of sickle RBCs and circulating leucocytes to the endothelium disrupts the maintenance of blood flow, and initiates vaso-occlusion. The increased transit time of RBC in the capillaries enhances oxygen release from RBC, thereby promoting HbS polymerisation, which increases the risk of VOC.

Repetition of microinfarcts (subclinical ischaemia-reperfusion events), as well as an elevated auto-oxidation rate of haemoglobin S, increase the generation of a high amount of reactive oxygen species (ROS) in SCD in comparison with healthy individuals,^{31–33} which plays a major role in the pathophysiology of SCD. This increased oxidative stress observed in patients with SCD³⁴ limits NO bioavailability (by reacting with the superoxide anion that generates peroxynitrite) and causes endothelial dysfunction with increased vascular adhesiveness.^{34–35} Oxidative stress also causes severe alterations in RBC rheology in the general population, as well as in SCD individuals, but the magnitude of these alterations is higher in SCD.^{36–38} Decreased RBC antioxidant defences make SCD RBCs more susceptible to oxidative alterations than healthy RBCs.³⁶

Except for gene therapy, which has shown efficiency in a mouse model of SCD,^{39–40} and haematopoietic stem cell transplantation limited to the patients with most severe SCD having a sibling donor,⁴¹ there is, to date, no curative treatment for SCD. The mainstay of treatment involves the management of symptoms and/or the lowering of the recurrent risk of several complications, by using hydration, transfusion and/or hydroxyurea medication.⁴² Deciphering the mechanisms that may modulate vascular function, oxidative stress and blood rheology in SCD is a priority, to find new therapeutic options to be explored in the context of not only managing the crisis, but also for prevention of VOC and improvement of vascular function. While intense acute exercise may trigger severe and painful VOC in patients with SCD, it can be speculated that regular physical activity could be an alternative strategy to improve the health status of SCD individuals, as this can be the case in other cardiovascular,⁴³ metabolic^{44–45} or respiratory⁴⁶ diseases.

This article reviews the literature on the specific biological responses of patients with SCD to acute or chronic exercise with special attention given to the clinical consequences.

ACUTE EXERCISE IN SCD

Blood rheology and RBC sickling

Exercise is characterised by an increased muscle oxygen demand compared to that during the resting level. The rise in muscle oxygen consumption is made possible by the increased muscle blood flow and oxygen delivery from the flowing RBCs. The increased release of oxygen from RBCs during exercise elevates the risk of HbS polymerisation in patients with SCD. Sproule *et al*⁴⁷ tested the effect of maximal exercise on arteriovenous difference and oxygen extraction in anaemic adults (4/9 patients had SCD). They found that the percentage of utilised O₂ (extracted) at maximal exercise intensity was 87% in anaemic

patients compared to 74% in controls. Unfortunately, that study did not differentiate patients with SCD from those with other types of anaemia.

In another study focusing on SCD children practising an acute bout of moderate intensity exercise (50% of maximal aerobic power), the arteriovenous content difference was lower in patients with SCD (compared to control subjects), while the percentage of available O₂ extracted from blood during exercise was higher in individuals with SCD.⁴⁸ Whether the enhanced muscle oxygen extraction during exercise in SCD increases the risk for RBC sickling and vaso-occlusion is probably dependent on the intensity of exercise. Platt⁴⁹ described the case of a patient with SCD who exhibited sporadic haemoglobinuria in response to intense exercise. The author suggested that the formation of dense and fragile sickle RBCs during vigorous exercise caused this complication. Indeed, from a rheological point of view, intense exercise is inappropriate and unsafe in SCD. At baseline, the disease is characterised by a reduction of RBC deformability, increased plasma viscosity and blood viscosity for a given haematocrit, and increased RBC aggregate strength in patients with SCD, compared to healthy individuals.⁵⁰ Acute exercise increases blood and plasma viscosities and RBC aggregation, and decreases RBC deformability in sedentary subjects, particularly when the effort is intense.⁵¹

Few studies have focused on the blood rheological responses of patients with SCD during an acute bout of submaximal exercise. Waltz *et al*⁵² recently reported no further alteration in RBC deformability in response to a short submaximal exercise of 10–12 min duration, compared to resting level, in a group of patients with SCD. Moreover, the authors noted a decrease in strength of RBC aggregates, which could be beneficial since this parameter has been associated with a risk of ACS.¹³ In another study, conducted in the Ivory Coast, 17 patients with SCD were subjected to a 20 min bout of moderate exercise (45 W).⁵³ Despite an increase in the percentages of dense RBCs at the end of the effort, blood viscosity did not change compared to resting level and no clinical complication was reported, as was the case in the study by Waltz *et al*.⁵²

Taken together, these studies suggest that acute intense exercise may present a risk for patients with SCD while mild-to-moderate exercise seems to be well tolerated. Nevertheless, some patients may experience moderate to severe haemoglobin desaturation during exercise, which could promote RBC sickling in conditions of prolonged hypoxaemic stress, even when the effort is submaximal and not very intense, as in the 6 min walking test.^{54–56} We therefore recommend screening for haemoglobin desaturation when patients with SCD perform efforts in a laboratory context to identify those at risks for exercise-induced hypoxaemia during submaximal efforts. Shorter exercises and prolonged recovery associated with appropriate hydration after exercise⁵⁷ should be promoted for these patients.

Inflammation/endothelial activation risks

Increased blood flow and viscosity during exercise result in rising wall shear stress. The increased viscosity directly impacts endothelial cells and may alter their structure.⁵⁸ As a consequence, in healthy subjects, circulating cytokine and leucocyte counts increase during exercise,^{59–61} with intensity and duration both modulating the magnitude of the responses.⁶² The adrenergic stress of the exercise seems to play a role in the recruitment of white cell counts in the peripheral blood. While most of the studies reported a rise of interleukin 6 (IL-6)—a cytokine with proinflammatory and anti-inflammatory effects—during

exercise,^{63 64} findings on tumour necrosis factor (TNF) α and IL-1 β are more controversial. Some authors observed that these cytokines increase,^{65–67} while others found no variations.^{68–70}

Exercise activates endothelial and circulating blood cells in healthy individuals. Intense exercise has been shown to increase plasma soluble (s) P-selectin,⁷¹ sL-selectin,^{72 73} neutrophil and platelet microparticles,⁷⁴ and sICAM-1^{75–77} and sVCAM-1.^{78 79} Leucocytes LFA-1 and MAC-1 integrin's expression has also reportedly been enhanced after an exercise bout.^{80–83} The rise in these molecules during exercise suggests strong cellular activation and increased adhesiveness between endothelial and circulating cells, features of the acute inflammatory response.^{80 84} However, these changes seem to depend on the exercise type, as no significant increase in these molecules has been observed after low-intensity exercises.⁸⁵

Few studies tested the effects of acute exercise on inflammatory, blood and endothelial cell activation biomarkers in heterozygous carriers of HbS (sickle cell trait: SCT). Because RBCs from SCT carriers contain only 30–45% HbS, HbS polymerisation and RBC sickling occur to a lesser extent than in SCD; so SCT carriers are usually asymptomatic. However, in some extreme conditions and rare cases, SCT carriers may experience exercise-related VOC-like events that could, debatably, lead to hyperkalaemia and rhabdomyolysis, and, ultimately, death.^{86–90} Monchanin *et al*⁹¹ showed that intense incremental exercise increased sVCAM-1, a marker of endothelial activation, but did not do so for sICAM-1 nor for TNF- α . This rise lasted until 2 h after exercise. In addition, while Tripette *et al*⁷³ did not observe the same increase in sVCAM-1 after three repeated incremental intense exercise tests under laboratory conditions, they did show significant increases in plasma sP-selectin and sL-selectin at the end of exercise. No significant difference between control and SCT subjects was described in response to low-intensity exercise.^{72 92} It was proposed that the elevated plasma adhesion molecule levels found in exercising SCT carriers might represent a risk for microcirculatory alterations, but the magnitude of change occurring during the effort is probably of limited consequence for the health of SCT individuals, except in rare cases.^{88 93 94}

Baseline levels of plasma-soluble adhesion molecules, or of adhesion molecules expressed on circulating endothelial cells, are much more elevated in patients with SCD than in healthy or SCT individuals.^{95 96} Indeed, further increases may trigger acute vaso-occlusive complications.⁹⁷ To the best of our knowledge, the inflammatory effects of exercise in patients with SCD have been investigated in only one study. Faes *et al*⁹⁸ evaluated the impact of a bout of moderate endurance exercise (20 min cycling exercise at 40 W) on biomarkers of endothelial activation in 11 patients with SCD, and found no change in sP-selectin or sE-selectin. Nevertheless, plasma sVCAM-1 and sICAM-1 were significantly increased over baseline measurements, suggesting endothelial activation. Despite these changes, no clinical complications were reported. The authors concluded that this type of exercise is probably safe in SCD, but longer or heavier exercises should be avoided or recommended only on a case-by-case basis.

Oxidative stress and NO metabolism-related risks

Acute exercise increases the generation of superoxide anions ($O_2^{\bullet-}$) and oxygen-derived intermediates⁹⁹ mainly through an inadequate coupling of electron transfers between complexes in the mitochondrial electron transport chain (ETC) that cause $O_2^{\bullet-}$ leaking,¹⁰⁰ which is evidently increased during aerobic exercise. Activation of the enzymes xanthine oxidase,¹⁰¹ NADPH oxidase and

myeloperoxidase, are also involved in $O_2^{\bullet-}$ production during exercise.^{102 103}

The consensus from most human and animal studies is that acute bouts of aerobic and anaerobic exercise increase oxidative stress. Dillard *et al*¹⁰⁴ were the first to show that an acute exercise bout at 75% of VO_2 max promoted lipid peroxidation. It was then shown that exhaustive exercise increased liver and muscle-free radical concentration twofold to threefold over baseline levels.¹⁰⁵ However, several other studies reported no effect of acute exercise on oxidative stress markers.¹⁰⁶ These discrepancies may be explained by the different exercise intensities and durations used in studies, as well as the heterogeneous training status of participants.¹⁰⁶ Age and diseases also affect the oxidative stress responses to exercise.^{107 108} Although the increased shear stress applied to endothelial and RBCs during exercise is a potent stimulus for NO production,¹⁰⁹ the bioavailability of NO is determined by the balance between, on the one hand, the extent of enzymatic and non-enzymatic formation of NO, and on the other hand, the removal process of NO, which is in part dependent on the reaction of NO with $O_2^{\bullet-}$ to form peroxynitrite (ONOO $^-$).

Few studies tested the effects of acute exercise on oxidative stress and NO metabolism in HbS carriers: three studies focused on SCT carriers^{72 110 111} and only one described the responses in SCD.⁹⁸

There is little difference between the oxidative stress and NO responses observed in SCT carriers and control subjects in response to exercise or during recovery.^{72 110} For instance, Das *et al*¹¹⁰ observed a very slight trend towards increased susceptibility to oxidation in SCT erythrocytes during exercise. Moreover, lipid peroxidation of RBCs, estimated by the measurement of the thiobarbituric acid-reactive substance, tended to slightly increase after acute submaximal exercise in SCT carriers, while it remained unchanged in control subjects.⁷² Finally, NO production was only slightly decreased 24 h after acute submaximal exercise in SCT carriers compared to a control group.⁷² However, another study observed significantly lower plasma nitrite/nitrate concentration in SCT subjects compared to controls right after a bout of intense exercise.¹¹¹ That study also reported that plasma protein oxidation measured by advanced oxidation protein products (AOPP) was increased in SCT carriers in response to maximal exercise, while malondialdehyde (MDA)—a polyunsaturated fatty acid oxidation end-product—remained higher in patients with SCD than in control subjects, during recovery.¹¹¹ Indeed, it seems that exercise intensity plays a key role in increasing the oxidative stress responses of SCT carriers. Whether or not the greater oxidative stress reported in SCT carriers during intense exercise is sufficient to trigger vaso-occlusive-like events should not be over-interpreted, since the responses are clearly of lower magnitude than those found in patients with SCD during VOC. Nevertheless, on the contrary, one could suggest that repeated acute oxidative stress during exercise could be at the origin of the haemorheological alterations and endothelial activation reported in SCT carriers, which, under specific exercise and environmental conditions, could trigger a cascade of deleterious events leading to the rare cases of exercise-related rhabdomyolysis reported in the literature.⁸⁸

Only one study investigated the effect of a single bout of mild-moderate endurance exercise (43 W for 20 min on cycle ergometer) on oxidative stress and NO metabolism in patients with SCD.⁹⁸ Patients with SCD exhibited similar increases in plasma oxidative stress markers (MDA, AOPP) in response to the exercise test compared to healthy individuals. Lower

Review

concentrations of NO end-products were found in individuals with SCD at rest and in response to the exercise test compared to the control group as a consequence of the greater level in nitrotyrosine, a marker of NO-consuming ONOO⁻ activity. Despite these differences, the kinetics of the changes in the markers oxidative stress and NO during exercise were very similar in the two groups. Of note, none of the patients involved in this study presented adverse events during or after exercise. The authors concluded that these patients may undertake mild–moderate physical activities but caution is required since further alterations in oxidative stress and NO metabolism could be more problematic in patients with SCD, leading to vascular dysfunction and VOC.¹¹²

REGULAR ACTIVITY IN SCD

Blood rheology

Several protocols of exercise training/regular activity have been tested in the general population, as well as in cardiovascular and metabolic diseases, to assess the effects on blood rheology.⁵¹ On the whole, regular physical activity results in an improvement in RBC deformability,^{113 114} a decrease in blood viscosity¹¹⁵ and adaptations in RBC aggregation.¹¹⁶ In contrast, the literature in SCD is not as well developed, but there have been several studies conducted either on SCT carriers, or, recently, in a murine model of SCD. These studies suggest that regular activity could also be beneficial in SCD. Diaw *et al*¹¹⁷ compared the blood viscosities of sedentary and trained SCT carriers, and found lower values in the second group. In another study, Faes *et al*¹¹⁸ subjected a group of sickle mice (transgenic SAD model) to regular physical activity (voluntary wheel activity running) and observed a decrease in blood viscosity compared to that seen in their sedentary counterparts. Since elevated blood viscosity is a risk factor for VOC,^{13 95} one may hypothesise that regular activity could limit the risk of VOC in SCD. Human studies are needed to address this question.

Inflammation/endothelial activation

Although several works have reported limited effects of exercise training on inflammatory and vascular adhesion molecules in healthy individuals,^{76 119} most studies have found that habitual physical activity is associated with chronic anti-inflammatory effects.^{60 120 121} Two important transversal studies showed that physical activity was negatively correlated with endothelial activation and inflammation.^{122 123} Another study showed that ageing-induced increases in plasma sICAM-1 levels were blunted by regular physical activity.¹²⁴

Similar findings have been reported in cardiovascular and/or immune diseases (chronic heart failure, myocardial infarction, peripheral arterial disease, diabetes, etc): regular physical activity decreases inflammation^{125–127} and endothelial activation, highlighted by the reduction of sVCAM-1,^{121 128} sICAM-1,^{121 128–132} sE-selectin^{129 133} and sP-selectin.^{132 134} Animal studies confirmed these results with a decrease in P-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 expression,^{135–137} or a decrease in leucocyte infiltration,^{138 139} observed in trained animal models of diseases compared to untrained animal models. Exercise training has also been shown to reduce white cell count adhesion *in vitro*.^{140 141}

The effects of habitual physical activity on inflammation and adhesion molecules have been recently described in SCT carriers and SCD animal models. Aufradet *et al*¹⁴² showed that exercise training in SCT carriers was associated with a decrease in endothelial activation, as evidenced by a reduction of plasma sVCAM-1 at rest and after intense exercise in trained compared

to sedentary SCT carriers. In addition, sP-selectin and sE-selectin during recovery were also decreased in trained SCT carriers.¹⁴² Our group recently investigated the effects of 8 weeks of voluntary wheel running on the pulmonary endothelial activation status of sickle SAD mice.¹⁴³ While hypoxia/reoxygenation (H/R) stress increased pulmonary VCAM-1 in sedentary sickle SAD mice, regular physical activity in these mice prevented the increase after H/R.¹⁴⁴ These findings suggest that regular training could improve vascular function and inflammation, thereby decreasing the risk of VOC-like events in SCD.

Oxidative stress and NO metabolism

Although the role of endothelium-derived NO during acute exercise has not been fully resolved, exercise training involving repetitive bouts of exercise over a sufficiently long period upregulates endothelial NO bioactivity.¹⁴⁵ Recently, several studies also demonstrated that RBCs are able to produce NO¹⁴⁶ and that regular training increases the activity of RBC endothelial-like NO synthase (NOS),¹¹⁴ consequently improving vascular reactivity.¹⁰⁹ In healthy populations and in individuals with cardiovascular disease, regular physical activity has been shown to improve the bioavailability of NO, enhance endogenous antioxidant defence and to decrease the expression of ROS-forming enzymes.¹⁴⁷

Chirico *et al*¹⁴⁸ recently looked at the relationship between training status and oxidative stress in SCT carriers. The authors observed higher levels of oxidative stress in response to a maximal exercise test in SCT carriers, compared to in control subjects. However, trained SCT carriers exhibited a blunted oxidative stress response in comparison to untrained SCT subjects. In addition, plasma antioxidant enzymes and NO metabolites were more elevated in response to acute exercise in trained, compared to sedentary, SCT carriers. These latter results suggest that the improvement in antioxidant enzymes occurring during endurance training, as was demonstrated in a healthy population,¹⁰⁶ may reverse the slight deleterious effects of SCT on oxidative stress and NO bioavailability in response to exercise.

Little information is available on the effects of chronic exercise in patients with SCD. Barbeau *et al*¹⁴⁹ previously reported that the repetition of 30 min of moderate exercise duration during three consecutive days induced a rise in plasma NO in patients with SCD. It was hypothesised that chronic moderate physical activity could improve NO bioavailability and thus vascular function in SCD. This is in agreement with recent work published by Charrin *et al*,¹⁵⁰ which showed that 8 weeks of voluntary exercise training decreased cardiac oxidative stress induced by H/R stress in SAD mice compared to in untrained mice. Improvement of antioxidant activity and lower haemolytic rate in the trained SAD mice may explain these adaptations. In addition, NO production, endothelial NOS (eNOS) messenger RNA expression and eNOS activation, were increased in the lungs of trained SAD mice after the H/R stress.¹⁵⁰ These results demonstrate that regular training in SCD could reduce oxidative stress, thereby decreasing the risks of developing chronic and acute complications in this disease.

RELATING THE RISKS AND BENEFITS OF EXERCISE IN A PATIENT WITH SCD: A RELATIONSHIP TO RECONSIDER?

Because exercise is considered to trigger sickling, therefore augmenting the risk of VOC and endothelial dysfunction, caution is required when patients with SCD intend to practise physical activity.¹⁵¹ Exercise intensity and environmental conditions are

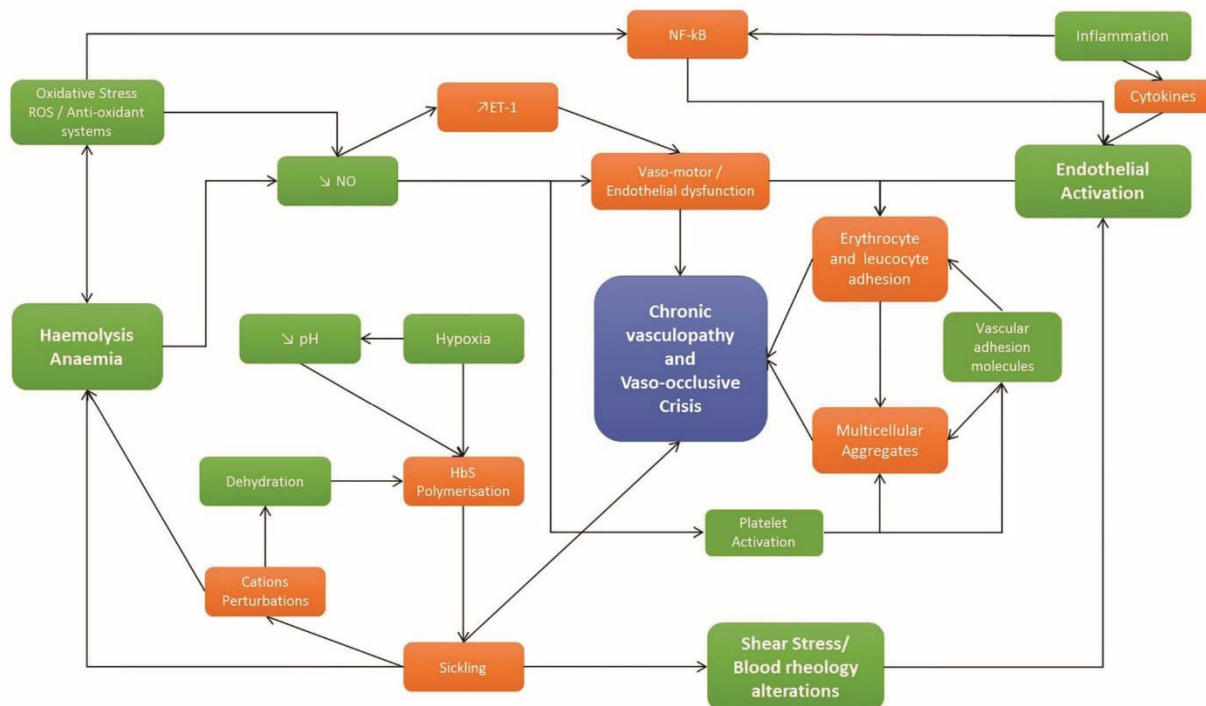


Figure 1 Effect of regular physical activity on selected factors involved in sickle cell disease (SCD) pathophysiology. This figure displays the main factors involved in the pathophysiology of chronic vasculopathy and vaso-occlusive crises in SCD. Oxidative stress has been shown to induce intravascular haemolysis leading to anaemia and endothelial dysfunction. Hypoxia, cellular dehydration or pH reduction induces red blood cell sickling, which in turn participate in creating blood rheological alterations. The latter, associated with chronic inflammation and vascular dysfunction, promote endothelial activation, which increase cell adhesion mechanisms and vaso-occlusive crisis. Green boxes display factors that may be positively affected by regular exercise in sickle cell trait, and sickle cell mice and patients. Orange boxes display parameters that could potentially be positively modified by habitual physical activity, because their stimulating factors are limited by exercise training. ET-1, endothelin-1; NF- κ B, nuclear factor κ B; NO, nitric oxide; ROS, reactive oxygen species.

also key factors to consider, since mild to moderate exercise associated with appropriate temperature and hydration is safe in this population. However, some patients, especially those who are clinically severe, may present higher risks during exercise and therefore a clinical follow-up should be advised to avoid any undesirable exercise-related effects.

The literature about the effects of regular activity in cardio-metabolic diseases, SCT carriers or SCD mice models, suggests that exercise training/physical rehabilitation could benefit

patients with SCD. Habitual physical activity is characterised by blood rheology improvements, anti-inflammatory effects, decreased endothelial activation, decreased oxidative stress and improved endothelial function (figure 1). Regular exercise serve as a multitarget therapeutic option to limit the pathophysiological mechanisms involved in SCD (figure 1). Further clinical trials, with particular attention given to exercise intensity and duration, environmental conditions and haemoglobin oxygen desaturation, will have to confirm these preliminary findings. The low motor and physical abilities of patients with SCD affect their employability, increase their familial and societal dependencies, and decrease their quality of life. If regular physical activity proves to be effective for improving their quality of life, it could be beneficial for a large number of patients all over the world, including in countries with limited access to medical resources.

Competing interests None declared.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- 1 Drépanocytose et santé publique. Colloque C.I.E. INSERM; Paris, France, 1991.
- 2 Gladwin MT, Vichinsky E. Pulmonary complications of sickle cell disease. *N Engl J Med* 2008;359:2254–65.
- 3 Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev* 2007;21:37–47.
- 4 Sabaa N, de Franceschi L, Bonnin P, *et al.* Endothelin receptor antagonism prevents hypoxia-induced mortality and morbidity in a mouse model of sickle-cell disease. *J Clin Invest* 2008;118:1924–33.

What are the new findings?

- ▶ The effects of an acute bout of exercise in sickle cell disease (SCD) are up-modulated by exercise intensity.
- ▶ Habitual physical activity blunts oxidative stress in models of SCD.
- ▶ Inflammation and endothelial activation are decreased by physical activity in models of SCD.

How might it impact on clinical practice in the future?

Moderate physical activity with appropriate safety advices could be prescribed in sickle cell disease patients.

Review

- 5 Rivera A. Reduced sickle erythrocyte dehydration in vivo by endothelin-1 receptor antagonists. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293:C960–6.
- 6 Nouriae M, Lee JS, Zhang Y, et al. The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. *Haematologica* 2013;98:464–72.
- 7 Camus SM, Gausseres B, Bonnin P, et al. Erythrocyte microparticles can induce kidney vaso-occlusions in a murine model of sickle cell disease. *Blood* 2012;120:5050–8.
- 8 Liu C, Zhao W, Christ GJ, et al. Nitric oxide scavenging by red cell microparticles. *Free Radic Biol Med* 2013;65:1164–73.
- 9 Connes P, Alexy T, Detterich J, et al. The role of blood rheology in sickle cell disease. *Blood Rev* 2005; doi: 10.1016/j.blre.2015.08.005
- 10 Kaul DK, Fabry ME, Nagel RL. The pathophysiology of vascular obstruction in the sickle syndromes. *Blood Rev* 1996;10:29–44.
- 11 Connes P, Lamarre Y, Hardy-Dessources MD, et al. Decreased hematocrit-to-viscosity ratio and increased lactate dehydrogenase level in patients with sickle cell anemia and recurrent leg ulcers. *PLoS ONE* 2013;8:e79680.
- 12 Connes P, Verlhac S, Bernaudin F. Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 2013;161:459–606.
- 13 Lamarre Y, Romana M, Waltz X, et al. Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease. *Haematologica* 2012;97:1641–7.
- 14 Lemonne N, Lamarre Y, Romana M, et al. Does increased red blood cell deformability raise the risk for osteonecrosis in sickle cell anemia? *Blood* 2013;121:3054–6.
- 15 Lamarre Y, Hardy-Dessources MD, Romana M, et al. Relationships between systemic vascular resistance, blood rheology and nitric oxide in children with sickle cell anemia or sickle cell-hemoglobin C disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014;58:307–16.
- 16 Setty BN, Stuart MJ, Dampier C, et al. Hypoxaemia in sickle cell disease: biomarker modulation and relevance to pathophysiology. *Lancet* 2003;362:1450–5.
- 17 Kaul DK, Finnegan E, Barabino GA. Sickle red cell-endothelium interactions. *Microcirculation* 2009;16:97–111.
- 18 Okpala I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. *Curr Opin Hematol* 2006;13:40–4.
- 19 Wun T. The role of inflammation and leukocytes in the pathogenesis of sickle cell disease. *Hematology* 2001;5:403–12.
- 20 Belcher JD, Bryant CJ, Nguyen J, et al. Transgenic sickle mice have vascular inflammation. *Blood* 2003;101:3953–9.
- 21 Frenette PS. Sickle cell vasoocclusion: heterotypic, multicellular aggregations driven by leukocyte adhesion. *Microcirculation* 2004;11:167–77.
- 22 Chaar V, Laurance S, Lapoumeroulie C, et al. Hydroxycarbamide decreases sickle reticulocyte adhesion to resting endothelium by inhibiting endothelial lutheran/basal cell adhesion molecule (Lu/BCAM) through phosphodiesterase 4A activation. *J Biol Chem* 2014;289:11512–21.
- 23 Okpala I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease—a red cell disorder. *Blood Rev* 2004;18:65–73.
- 24 Okpala I, Daniel Y, Haynes R, et al. Relationship between the clinical manifestations of sickle cell disease and the expression of adhesion molecules on white blood cells. *Eur J Haematol* 2002;69:135–44.
- 25 Belcher JD, Marker PH, Weber JP, et al. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood* 2000;96:2451–9.
- 26 Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 1994;330:1639–44.
- 27 Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood* 1998;91:288–94.
- 28 Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 1994;84:643–9.
- 29 Wood KC, Hebbel RP, Granger DN. Endothelial cell P-selectin mediates a proinflammatory and prothrombotic phenotype in cerebral venules of sickle cell transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H1608–14.
- 30 Mannino R, Myers DR, Sakurai Y, et al. Increased erythrocyte rigidity is sufficient to cause endothelial dysfunction in sickle cell disease. *Blood* 2012;120:2818.
- 31 Chirico EN, Pialoux V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life* 2012;64:72–80.
- 32 Hebbel RP, Morgan WT, Eaton JW, et al. Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:237–41.
- 33 Sheng K, Shariff M, Hebbel RP. Comparative oxidation of hemoglobins A and S. *Blood* 1998;91:3467–70.
- 34 Wood KC, Granger DN. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:926–32.
- 35 Gladwin MT, Barst RJ, Castro OL, et al. Pulmonary hypertension and NO in sickle cell. *Blood* 2010;116:852–4.
- 36 Hierso R, Waltz X, Mora P, et al. Effects of oxidative stress on red blood cell rheology in sickle cell patients. *Br J Haematol* 2014;166:601–6.
- 37 Barodka V, Mohanty JG, Mustafa AK, et al. Nitroprusside inhibits calcium-induced impairment of red blood cell deformability. *Transfusion* 2014;54:434–44.
- 38 Barodka VM, Nagababu E, Mohanty JG, et al. New insights provided by a comparison of impaired deformability with erythrocyte oxidative stress for sickle cell disease. *Blood Cells Mol Dis* 2014;52:230–5.
- 39 Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME, et al. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science* 2001;294:2368–71.
- 40 Pestina TI, Hargrove PW, Jay D, et al. Correction of murine sickle cell disease using gamma-globin lentiviral vectors to mediate high-level expression of fetal hemoglobin. *Mol Ther* 2009;17:245–52.
- 41 Payen E, Leboulch P. Advances in stem cell transplantation and gene therapy in the b-hemoglobinopathies. *Hematology* 2012;2012:276–83.
- 42 Platt OS. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. *N Engl J Med* 2008;358:1362–9.
- 43 Yung LM, Laher I, Yao X, et al. Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (part 2). *Sports Med* 2009;39:45–63.
- 44 Vasconcellos F, Seabra A, Katzmarzyk PT, et al. Physical activity in overweight and obese adolescents: systematic review of the effects on physical fitness components and cardiovascular risk factors. *Sports Med* 2014;44:1139–52.
- 45 Krause M, Rodrigues-Krause J, O'Hagan C, et al. The effects of aerobic exercise training at two different intensities in obesity and type 2 diabetes: implications for oxidative stress, low-grade inflammation and nitric oxide production. *Eur J Appl Physiol* 2014;114:251–60.
- 46 Boyd A, Yang CT, Estell K, et al. Feasibility of exercising adults with asthma: a randomized pilot study. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2012;8:13.
- 47 Sproule BJ, Mitchell JH, Miller WF. Cardiopulmonary physiological responses to heavy exercise in patients with anemia. *J Clin Invest* 1960;39:378–88.
- 48 Pianosi P, D'Souza SJ, Charge TD, et al. Cardiac output and oxygen delivery during exercise in sickle cell anemia. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:231–5.
- 49 Platt OS. Exercise-induced hemolysis in sickle cell anemia: shear sensitivity and erythrocyte dehydration. *Blood* 1982;59:1055–60.
- 50 Tripette J, Alexy T, Hardy-Dessources MD, et al. 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* 2009;94:1060–5.
- 51 Connes P, Simmonds MJ, Brun JF, et al. Exercise hemorheology: classical data, recent findings and unresolved issues. *Clin Hemorheol Microcirc* 2013;53:187–99.
- 52 Waltz X, Hedreville M, Sinnaph S, et al. Delayed beneficial effect of acute exercise on red blood cell aggregate strength in patients with sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc* 2012;52:15–26.
- 53 Balayssac-Siransy E, Connes P, Tuo N, et al. Mild haemorheological changes induced by a moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 2011;154:398–407.
- 54 Campbell A, Minniti CP, Nouriae M, et al. Prospective evaluation of haemoglobin oxygen saturation at rest and after exercise in paediatric sickle cell disease patients. *Br J Haematol* 2009;147:352–9.
- 55 Waltz X, Romana M, Hardy-Dessources M-D, et al. Hematological and hemorheological determinants of the six-minute walk test performance in children with sickle cell anemia. *PLoS ONE* 2013;8:e77830.
- 56 Halphen I, Elie C, Brousse V, et al. Severe nocturnal and postexercise hypoxia in children and adolescents with sickle cell disease. *PLoS ONE* 2014;9:e97462.
- 57 Charlot K, Waltz X, Hedreville M, et al. Impaired oxygen uptake efficiency slope and off-transient kinetics of pulmonary oxygen uptake in sickle cell anemia are associated with hemorheological abnormalities. *Clin Hemorheol Microcirc* 2015;60:413–21.
- 58 Marsh SA, Coombs JS. Exercise and the endothelial cell. *Int J Cardiol* 2005;99:165–9.
- 59 Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL. The immune response to exercise. *Semin Hematol* 1994;31:166–79.
- 60 Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev* 2000;80:1055–81.
- 61 Shephard RJ, Rhind S, Shek PN. Exercise and training: influences on cytotoxicity, interleukin-1, interleukin-2 and receptor structures. *Int J Sports Med* 1994;15 (Suppl 3):S154–66.
- 62 Gleeson M. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol* 2007;103:693–9.
- 63 Pedersen BK, Steensberg A, Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J Physiol* 2001;536(Pt 2):329–37.
- 64 Suzuki K, Totsuka MN, SHIGEYUKI, et al. Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. *J Appl Physiol* 1999;84:1360–7.
- 65 Nieman DC, Henson DA, Smith LL, et al. Cytokine changes after a marathon race. *J Appl Physiol* 2001;91:109–14.
- 66 Sprenger H, Jacobs C, Nain M, et al. Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;63:188–95.

- 67 Zaldivar F, Wang-Rodriguez J, Nemet D, *et al.* Constitutive pro- and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. *J Appl Physiol* 2006;100:1124–33.
- 68 Drenth JP, Van Uum SH, Van Deuren M, *et al.* Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production. *J Appl Physiol* 1995;79:1497–503.
- 69 Ostrowski K, Hermann C, Bangash A, *et al.* A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *J Physiol* 1998;513 (Pt 3):889–94.
- 70 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;98:525–34.
- 71 Mockel M, Ulrich NV, Heller G Jr, *et al.* Platelet activation through triathlon competition in ultra-endurance trained athletes: impact of thrombin and plasmin generation and catecholamine release. *Int J Sports Med* 2001;22:337–43.
- 72 Tripette J, Connes P, Beltan E, *et al.* 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* 2010;45:39–52.
- 73 Tripette J, Connes P, Hedreville M, *et al.* Patterns of exercise-related inflammatory response in sickle cell trait carriers. *Br J Sports Med* 2010;44:232–7.
- 74 Chaar V, Romana M, Tripette J, *et al.* Effect of strenuous physical exercise on circulating cell-derived microparticles. *Clin Hemorheol Microcirc* 2011;47:15–25.
- 75 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;86:185–90.
- 76 Baum M, Liesen H, Enneper J. Leucocytes, lymphocytes, activation parameters and cell adhesion molecules in middle-distance runners under different training conditions. *Int J Sports Med* 1994;15(Suppl 3):S122–6.
- 77 Rehman J, Mills PJ, Carter SM, *et al.* Dynamic exercise leads to an increase in circulating ICAM-1: further evidence for adrenergic modulation of cell adhesion. *Brain Behav Immun* 1997;11:343–51.
- 78 Schmidt-Lucke C, Reinhold D, Ansoorge S, *et al.* 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* 2003;10:159–65.
- 79 Signorelli SS, Mazzarino MC, Pino LD, *et al.* High circulating levels of cytokines (IL-6 and TNF α), adhesion molecules (VCAM-1 and ICAM-1) and selectins in patients with peripheral arterial disease at rest and after a treadmill test. *Vascu Med* 2003;8:15–19.
- 80 Nielsen HG, Lyberg T. Long-distance running modulates the expression of leucocyte and endothelial adhesion molecules. *Scand J Immunol* 2004;60:356–62.
- 81 Goebel MU, Mills PJ. Acute psychological stress and exercise and changes in peripheral leukocyte adhesion molecule expression and density. *Psychosom Med* 2000;62:664–70.
- 82 Nemet D, Mills PJ, Cooper DM. Effect of intense wrestling exercise on leukocytes and adhesion molecules in adolescent boys. *Br J Sports Med* 2004;38:154–8.
- 83 Simpson RJ, Florida-James GD, Whyte GP, *et al.* 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* 2006;97:109–21.
- 84 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;40:765–70.
- 85 Jilka B, Eichler HG, Stohlawetz P, *et al.* Effects of exercise on circulating vascular adhesion molecules in healthy men. *Immunobiology* 1997;197:505–12.
- 86 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* 2007;103:2138–40; discussion 40–1.
- 87 Le Gallais D, Lonsdorfer J, Bogui P, *et al.* Point: sickle cell trait should be considered asymptomatic and as a benign condition during physical activity. *J Appl Physiol* 2007;103:2137–8; discussion 41.
- 88 O'Connor FG, Bergeron MF, Cantrell J, *et al.* ACSM and CHAMP summit on sickle cell trait: mitigating risks for Warfighters and athletes. *Med Sci Sports Exerc* 2012;44:2045–56.
- 89 Loosemore M, Walsh SB, Morris E, *et al.* Sudden exertional death in sickle cell trait. *Br J Sports Med* 2012;46:312–4.
- 90 Connes P. Sickle cell trait, exertional rhabdomyolysis, and compartment syndrome. *Lancet* 2015;385:1948.
- 91 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;102:169–73.
- 92 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;40:89–97.
- 93 Goldsmith JC, Bonham VL, Joiner CH, *et al.* Framing the research agenda for sickle cell trait: building on the current understanding of clinical events and their potential implications. *Am J Hematol* 2012;87:340–6.
- 94 Tripette J, Hardy-Dessources MD, Romana M, *et al.* Exercise-related complications in sickle cell trait. *Clin Hemorheol Microcirc* 2013.
- 95 Nebor D, Bowers A, Hardy-Dessources MD, *et al.* Frequency of pain crises in sickle cell anemia and its relationship with the sympatho-vagal balance, blood viscosity and inflammation. *Haematologica* 2011;96:1589–94.
- 96 Solovey A, Lin Y, Browne P, *et al.* Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1997;337:1584–90.
- 97 Blum A, Yeganeh S, Peleg A, *et al.* Endothelial function in patients with sickle cell anemia during and after sickle cell crises. *J Thromb Thrombolysis* 2005;19:83–6.
- 98 Faes C, Balayssac-Siransy E, Connes P, *et al.* Moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia: effects on oxidative stress and endothelial activation. *Br J Haematol* 2014;164:124–30.
- 99 Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol (1985)* 1995;79:675–86.
- 100 Treberg JR, Quinlan CL, Brand MD. Evidence for two sites of superoxide production by mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* 2011;286:27103–10.
- 101 Vina J, Gimeno A, Sastre J, *et al.* Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life* 2000;49:539–44.
- 102 Dong J, Chen P, Wang R, *et al.* NADPH oxidase: a target for the modulation of the excessive oxidative damage induced by overtraining in rat neutrophils. *Int J Biol Sci* 2011;7:881–91.
- 103 Morozov VI, Tsyplenkov PV, Golberg ND, *et al.* The effects of high-intensity exercise on skeletal muscle neutrophil myeloperoxidase in untrained and trained rats. *Eur J Appl Physiol* 2006;97:716–22.
- 104 Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, *et al.* Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol* 1978;45:927–32.
- 105 Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, *et al.* Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;107:1198–205.
- 106 Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr* 2000;72(2 Suppl):637S–46S.
- 107 Fatouros IG, Jamurtas AZ, Viliotiou V, *et al.* Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36:2065–72.
- 108 Vincent HK, Morgan JW, Vincent KR. Obesity exacerbates oxidative stress levels after acute exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36:772–9.
- 109 Simmonds MJ, Detterich JA, Connes P. Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell. *Biorheology* 2014;51:121–34.
- 110 Das SK, Hinds JE, Hardy RE, *et al.* Effects of physical stress on peroxide scavengers in normal and sickle cell trait erythrocytes. *Free Radic Biol Med* 1993;14:139–47.
- 111 Faes C, Martin C, Chirico EN, *et al.* Effect of α -thalassaemia on exercise-induced oxidative stress in sickle cell trait. *Acta Physiol (Oxf)* 2012;205:541–50.
- 112 Krajewski ML, Hsu LL, Gladwin MT. 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* 2008;295:H4–7.
- 113 Smith JA, Martin DT, Telford RD, *et al.* Greater erythrocyte deformability in world-class endurance athletes. *Am J Physiol* 1999;276(6 Pt 2):H2188–93.
- 114 Suhr F, Brenig J, Muller R, *et al.* Moderate exercise promotes human RBC-NOS activity, NO production and deformability through Akt kinase pathway. *PLoS ONE* 2012;7:e45982.
- 115 Brun JF, Khaled S, Raynaud E, *et al.* The triphasic effects of exercise on blood rheology: which relevance to physiology and pathophysiology? *Clin Hemorheol Microcirc* 1998;19:89–104.
- 116 Connes P, Frank S, Martin C, *et al.* New fundamental and applied mechanisms in exercise hemorheology. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010;45:131–41.
- 117 Diaw M, Diop S, Soubaiga FY, *et al.* Blood viscosity is lower in trained than in sedentary sickle cell trait carriers. *Clin Hemorheol Microcirc* 2015;61:23–9.
- 118 Faes C, Charrin E, Connes P, *et al.* Chronic physical activity limits blood rheology alterations in transgenic SAD mice. *Am J Hematol* 2015;90:E32–3.
- 119 Kop WJ, Weinstein AA, Deuster PA, *et al.* Inflammatory markers and negative mood symptoms following exercise withdrawal. *Brain Behav Immun* 2008;22:1190–6.
- 120 Kaspis C, Thompson PD. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1563–9.
- 121 Adamopoulos S, Parisis J, Kroupis C, *et al.* Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 2001;22:791–7.
- 122 Demerath E, Towne B, Blangero J, *et al.* The relationship of soluble ICAM-1, VCAM-1, P-selectin and E-selectin to cardiovascular disease risk factors in healthy men and women. *Ann Hum Biol* 2001;28:664–78.
- 123 Rohde LE, Hennekens CH, Ridker PM. Cross-sectional study of soluble intercellular adhesion molecule-1 and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1595–9.

Review

- 124 Many GM, Jenkins NT, Witkowski S, *et al.* The effects of aerobic training and age on plasma sICAM-1. *Int J Sports Med* 2013;34:253–7.
- 125 Balducci S, Zanuso S, Nicolucci A, *et al.* 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* 2010;20:608–17.
- 126 Pierce GL, Schofield RS, Casey DP, *et al.* 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* 2008;15:10–18.
- 127 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;39:653–63.
- 128 Ribeiro F, Alves AJ, Teixeira M, *et al.* Exercise training increases interleukin-10 after an acute myocardial infarction: a randomised clinical trial. *Int J Sports Med* 2012;33:192–8.
- 129 Saetre T, Enoksen E, Lyberg T, *et al.* Supervised exercise training reduces plasma levels of the endothelial inflammatory markers E-selectin and ICAM-1 in patients with peripheral arterial disease. *Angiology* 2011;62:301–5.
- 130 Strohacker K, Wing RR, McCaffery JM. Contributions of body mass index and exercise habits on inflammatory markers: a cohort study of middle-aged adults living in the USA. *BMJ Open* 2013;3:pii: e002623.
- 131 Wegge JK, Roberts CK, Ngo TH, *et al.* Effect of diet and exercise intervention on inflammatory and adhesion molecules in postmenopausal women on hormone replacement therapy and at risk for coronary artery disease. *Metabolism* 2004;53:377–81..
- 132 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;16:543–9.
- 133 Hjelstuen A, Anderssen SA, Holme I, *et al.* Markers of inflammation are inversely related to physical activity and fitness in sedentary men with treated hypertension. *Am J Hypertens* 2006;19:669–75.
- 134 Bjornstad HH, Bruvik J, Bjornstad AB, *et al.* Exercise training decreases plasma levels of soluble CD40 ligand and P-selectin in patients with chronic heart failure. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2008;15:43–8.
- 135 Yang AL, Chen HI. Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. *Atherosclerosis* 2003;169:11–17.
- 136 Yang AL, Jen CJ, Chen HI. Effects of high-cholesterol diet and parallel exercise training on the vascular function of rabbit aortas: a time course study. *J Appl Physiol* 2003;95:1194–200.
- 137 Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, *et al.* 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* 2010;16:105–18.
- 138 Chakraphan D, Sridulyakul P, Thipakorn B, *et al.* Attenuation of endothelial dysfunction by exercise training in STZ-induced diabetic rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2005;32:217–26.
- 139 Pastva A, Estell K, Schoeb TR, *et al.* Aerobic exercise attenuates airway inflammatory responses in a mouse model of atopic asthma. *J Immunol* 2004;172:4520–6.
- 140 Mills PJ, Hong S, Redwine L, *et al.* Physical fitness attenuates leukocyte-endothelial adhesion in response to acute exercise. *J Appl Physiol* 2006;101:785–8.
- 141 Seneczko F. White blood cell count and adherence in sportsmen and non-training subjects. *Acta Physiol Pol* 1983;34:601–10.
- 142 Aufradet E, Monchanin G, Oyonno-Engelle S, *et al.* Habitual physical activity and endothelial activation in sickle cell trait carriers. *Med Sci Sports Exerc* 2010;42:1987–94.
- 143 Aufradet E, Douillard A, Charrin E, *et al.* Physical activity limits pulmonary endothelial activation in sickle cell SAD mice. *Blood* 2014; 123:2745–7.
- 144 Aufradet E, Desouza G, Bourgeois V, *et al.* Hypoxia/reoxygenation stress increases markers of vaso-occlusive crisis in sickle SAD mice. *Clin Hemorheol Microcirc* 2013;54:297–312.
- 145 Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R, *et al.* Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports Med* 2003;33:1013–35.
- 146 Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, *et al.* Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase 10.1182/blood-2005-10-3992. *Blood* 2006;107:2943–51.
- 147 Gliemann L, Nyberg M, Hellsten Y. Nitric oxide and reactive oxygen species in limb vascular function: what is the effect of physical activity? *Free Radic Res* 2014;48:71–83.
- 148 Chirico EN, Martin C, Faes C, *et al.* Exercise training blunts oxidative stress in sickle cell trait carriers. *J Appl Physiol* 2012;112:1445–53.
- 149 Barbeau P, Woods KF, Ramsey LT, *et al.* Exercise in sickle cell anemia: effect on inflammatory and vasoactive mediators. *Endothelium* 2001;8:147–55.
- 150 Charrin E, Aufradet E, Douillard A, *et al.* Oxidative stress is decreased in physically active sickle cell SAD mice. *Br J Haematol* ; 2015;168:747–56.
- 151 Connes P, Machado R, Hue O, *et al.* Exercise limitation, exercise testing and exercise recommendations in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc* 2011;48:1–13.

Résumé : La drépanocytose est une hémoglobinopathie grave caractérisée par des crises vaso-occlusives (CVOs) récurrentes et douloureuses ainsi que par une anémie hémolytique notamment dues à une inflammation vasculaire et un stress oxydant chroniques. Le caractère imprévisible des CVOs et les dommages tissulaires sévères et multifocaux subséquents rendent extrêmement difficile l'établissement d'un traitement efficace, expliquant pourquoi, à ce jour, il n'existe encore aucun traitement curatif applicable à l'ensemble de la population drépanocytaire. Sur la base de travaux réalisés précédemment dans d'autres maladies, l'objectif de ce projet était de tester l'hypothèse d'effets modulateurs favorables de l'activité physique régulière d'une part et de vérifier l'implication d'un modulateur du stress oxydant et de l'inflammation, le RAGE (Receptor of advanced glycation end products) d'autre part, dans la drépanocytose. La 1^{ère} étude montre qu'un entraînement sur roue d'activité pouvait améliorer le métabolisme du NO pulmonaire et limiter le stress oxydant cardiaque ainsi que l'hémolyse chez un modèle murin modérément sévère de drépanocytose, la souris SAD. Par la suite nous avons réalisé une étude de caractérisation phénotypique du modèle Townes plus sévère, afin de cibler plus précisément les molécules et organes d'intérêt et d'optimiser les deux derniers protocoles portant sur ce modèle de souris. L'étude 3 complète alors la 1^{ère} étude en mettant en évidence une amélioration de l'oxygénation veineuse et une baisse de l'inflammation systémique et rénale ainsi que de la congestion splénique par l'entraînement sportif chez les souris Townes, à l'état stable. Enfin la 4^{ème} étude démontre une implication importante des RAGEs dans la physiopathologie drépanocytaire. En effet, l'inhibition spécifique de ces récepteurs semble limiter les processus hémolytiques, l'expression hépatique et rénale de marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation et stimuler l'expression d'eNOS ainsi que la concentration plasmatique en métabolites du NO chez les souris Townes. Il ressort de ce travail de thèse, des éléments prometteurs quant à l'utilisation thérapeutique de l'entraînement sportif ou de l'inactivation des RAGEs dans la drépanocytose bien que des études complémentaires chez l'Homme et la souris soient respectivement nécessaires avant de confirmer ces conclusions.

Mots clés : Drépanocytose, inflammation, stress oxydant, oxyde nitrique, souris transgéniques, entraînement physique, récepteur aux AGE.

Study of mechanisms involved in inflammation, oxidative stress and nitric oxide metabolism in transgenic sickle cell mice using pharmacological and physical exercise interventions

Abstract: Sickle cell disease (SCD) is a severe hemoglobinopathy punctuated by recurrent painful vaso-occlusive crises (VOC) and by hemolytic anemia mainly due to chronic vascular inflammation and oxidative stress. VOCs are unpredictable and lead to serious multifocal organ damages making difficult the development of effective treatment and explaining why there is still no curative therapy applicable to the entire SCD population. Based on previous studies, the aim of this work was to characterize the effects of i) moderate exercise training ii) the contribution of RAGE (Receptor for advanced glycation end products) which is a modulator of oxidative stress and inflammation, to the vicious circle of SCD. The first study shows that voluntary wheel running improved NO metabolism in lungs and blunted cardiac oxidative stress and hemolysis in SAD mice presenting a mild phenotype of SCD. We then proceed to a phenotypic characterization of a severe SCD mouse model (Townes) to target more precisely molecules and organs of interest in order to optimize following protocols. The third study completes data from the first study in highlighting a better venous oxygenation, a decrease in systemic and renal inflammation and a limited splenic congestion after exercise training in sickle Townes mice. Ultimately, the fourth study highlights the involvement of RAGE in the SCD pathophysiology. Indeed, specific inhibition of RAGE may reduce hemolysis, blunt expression of oxidative stress and inflammation markers in the liver and kidney and stimulates endothelial NO synthase as well as plasma NO metabolites in sickle Townes mice. It has emerged from this work promising new data regarding the therapeutic use of exercise training or RAGE inhibition in SCD. Nonetheless, additional studies on humans are required before confirming our conclusions.

Key words : Sickle cell disease, inflammation, oxidative stress, nitric oxide, transgenic sickle mice, exercise training, receptor of AGE.