



**HAL**  
open science

# EFFETS D'UN ENTRAINEMENT EN ENDURANCE SUR LES CARACTERISTIQUES MUSCULAIRES DES PATIENTS DREPANOCYTAIRES HOMOZYGOTES

Angèle Merlet

► **To cite this version:**

Angèle Merlet. EFFETS D'UN ENTRAINEMENT EN ENDURANCE SUR LES CARACTERISTIQUES MUSCULAIRES DES PATIENTS DREPANOCYTAIRES HOMOZYGOTES. Médecine humaine et pathologie. Université de Lyon; Université catholique de Louvain (1970-..), 2018. Français. NNT : 2018LYSES036 . tel-02917995

**HAL Id: tel-02917995**

**<https://theses.hal.science/tel-02917995>**

Submitted on 20 Aug 2020

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

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



**THÈSE DE SCIENCES**  
*réalisée en cotutelle internationale*

Pour obtenir les grades de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LYON  
&  
DOCTEUR EN SCIENCES DE LA MOTRICITÉ

**École doctorale** : Sciences, Ingénierie et Santé (488)  
**Spécialité** : Biologie et Physiologie de l'Exercice & Sciences de la Motricité

Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (EA 7424)  
&  
Institute of NeuroScience, Physiologie et biochimie de l'exercice

Présentée et soutenue publiquement le 29 octobre 2018 par :

**Angèle MERLET**

---

**EFFETS D'UN ENTRAÎNEMENT EN ENDURANCE SUR LES  
CARACTERISTIQUES MUSCULAIRES DES PATIENTS  
DREPANOCYTAIRES HOMOZYGOTES**

---

Devant le jury composé de :

Pr Nathalie <b>KOULMANN</b> Dr Claire <b>THOMAS-JUNIUS</b>	Institut Recherche Biomédicale des Armées Institut National Sport Expertise Performance	Rapporteure Rapporteure
Pr Louise <b>DELDICQUE</b> Pr Frédéric <b>GALACTÉROS</b>	Université Catholique de Louvain (Belgique) AP-HP Hôpital Henri Mondor	Examinatrice Examineur
Pr Léonard <b>FÉASSON</b> Pr Marc <b>FRANCAUX</b> Pr Laurent <b>MESSONNIER</b>	Université Jean Monnet, Saint-Etienne Université Catholique de Louvain (Belgique) Université Savoie Mont Blanc	Directeur de thèse Directeur de thèse Co-directeur de thèse

# REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à remercier le **Docteur Claire Thomas-Junius** et le **Professeur Nathalie Koulmann** d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et de me faire l'honneur d'expertiser ce travail. Je remercie également les **Professeurs Frédéric Galactéros** et **Louise Deldicque** de leur présence à mon jury de thèse et de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.*

*Pour ma part, ces trois années de thèse ne constituent pas seulement une aventure scientifique, mais avant tout une aventure humaine mais aussi culturelle... Car de Nantes à Saint-Etienne et de Saint-Etienne à Louvain-la-Neuve, j'ai eu le privilège de rencontrer des personnes incroyables mais aussi d'enrichir mon langage d'expressions belgo-stéphanoises... Cette belle aventure n'aurait jamais été possible sans la confiance accordée par mes directeurs de thèse, **Léo, Laurent** et **Marc**.*

***Léo, Laurent**, il m'est difficile d'écrire ces quelques lignes tant ces 3 années ont passé vite. Vous m'avez accueilli à bras ouverts dans cette aventure. Alors que le microscope et le paillasse m'étaient inconnus, vous m'avez fait confiance et permis de m'adapter très rapidement à ce nouvel environnement. Chacun à votre manière, vous avez réussi à me transmettre votre passion scientifique. **Léo**, un immense merci pour ta confiance, ta bienveillance, tes encouragements et ta bonne humeur « presque » quotidienne. Merci également pour l'autonomie que tu m'as accordée durant ces 3 années. Malgré ton emploi du temps de ministre, tu as toujours su être disponible et attentif. Je te remercie aussi pour tous ces moments « non-scientifiques » passés ensemble. Te faire découvrir les spécialités culinaires de ma ville natale aura été un plaisir, les livraisons de « chef chef » vont malheureusement s'arrêter là. **Laurent**, un très grand merci pour ton encadrement, ton implication et ta grande disponibilité durant cette thèse, et ce malgré la distance. Tes conseils avisés et tes corrections m'auront fait beaucoup progresser au niveau scientifique. **Marc**, un grand merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire à Louvain-la-Neuve. Grâce à vous cette cotutelle de thèse a été très bénéfique sur le plan scientifique et m'a beaucoup apporté sur le plan personnel. Je tiens également à remercier **Louise** d'avoir été présente au quotidien à Louvain-la-Neuve mais surtout pour ses précieux conseils méthodologiques et scientifiques.*

*Je souhaite particulièrement remercier toute l'équipe « ExDre », médecins, chercheurs, infirmières mais surtout les patients, rien n'aurait été possible sans leur engagement et leur constance. Qu'ils en soient ici profondément remerciés.*

*Je tiens bien sûr à remercier l'ensemble des membres de l'IRMIS et du LIBM de St-Etienne (**Marion P, Thierry, Rodolphe, Marie Pierre V, Bernard, Joséphine, Houria, Clément, Guillaume, Thomas, Vianney, Marie, Pascal, Anne-Cécile, Damien**, difficile de tous vous citer...) pour m'avoir accueillie durant ces 3 années. **Marie-Pierre B, Dominique**, merci d'avoir été présentes au quotidien pour m'aider dans l'apprentissage des différentes techniques et surtout pour répondre à mes milliers de questions (même les plus bêtes). Grâce à vous, je me sens maintenant chez moi dans un laboratoire. **Marie-Pierre**, je n'oublierai jamais ton sourire et ta bonne humeur quotidienne, je te souhaite maintenant de profiter de tes merveilleuses « grandes vacances », tu les as amplement méritées. N'oublie pas, où que je sois, tu es invitée ! **Dominique**, je te souhaite beaucoup de courage pour affronter cette épreuve. Mention spéciale au **Pr émérite André Geyssant**, j'ai beaucoup apprécié nos discussions sportives et votre bonne humeur contagieuse ! Merci également à tous mes collègues de bureau passés ou actuels*

*(Robin, Thibault, Marie, Loïc, Léa, Giorgio, Alex R, Marion R, Djahid...) et les doctorants « d'en face » (Anne-Cloé, David, Nadir, Agnès...). Nos pauses cafés et déjeuners vont me manquer ! Marion R, j'ai été ravie de prendre la suite de ton magnifique travail. Grâce à toi, j'ai été initiée au hockey sur gazon, non sans quelques dommages aux pieds... Côté chambérien, un immense merci à Christophe pour ton aide technique et ta pédagogie ! Merci également à tous les membres du labo PIB d'avoir pris soin de ma chère plante, un jour je viendrai la récupérer !!! ;)*

*Je tiens aussi à remercier chaleureusement mes collègues belges (Céline, Estelle B, Estelle D, Rodrigo, Mehdi, Geoffrey, Florian, Karol...) et tous les autres membres du laboratoire. Merci à vous de m'avoir accueillie si chaleureusement. Je n'oublierai pas nos « cake-break » suivis, on peut le dire, de nombreuses bières. Céline, je te remercie particulièrement de m'avoir accueillie dans ton bureau et aussi pour nos longues discussions tant personnelles que scientifiques. Je te souhaite le meilleur pour la suite.*

*Je tiens également à remercier toute l'équipe de Daniel Béchet pour m'avoir accueillie à l'INRA de Clermont-Ferrand pendant plusieurs semaines. Cécile, un très grand merci pour ton aide technique et ton dynamisme, j'ai été ravie de collaborer avec toi. Alice, un immense merci pour tous ces moments passés à Saint-Etienne, à Clermont ou à Lyon où, l'une et l'autre, avons de très nombreuses fois « squatté » nos canapés respectifs.*

*Un grand merci également à Zhiguo He pour ta disponibilité et tes conseils avisés pour nos manip en immunohistologie. Ce fut un plaisir de collaborer avec toi !*

*Si ma vie à Saint-Etienne et à Louvain-la-Neuve a été aussi agréable et enrichissante, c'est en partie grâce à mes différents colocataires stéphanois et belges. Alex, mon aventure stéphanoise a commencé grâce à toi. Un grand merci de m'avoir intégrée dans la vie stéphanoise. Léa, tu es passée du statut de coloc à celui de stagiaire, qui l'aurait cru ? je suis très fière de ton parcours et je te souhaite beaucoup de courage pour ces années studieuses à venir. Lulutz, toujours aussi chiant mais je t'aime bien quand même ! André, un immense merci de nous avoir accueillis à Madère, sur ton île natale. Thomas, le « 5<sup>ème</sup> coloc », dois-je te remercier pour ces récits et photos post-chirurgie quotidiens ? Hum, pas sur... Et que dire de la coloc aventure version belge (Flore, Laurence, Jill, Guillaume et Sylvain), plus qu'une colocation, une vraie famille. Je ne pourrai jamais assez vous remercier, tellement votre accueil a été chaleureux. Grâce à vous je « sais » passer le sel. Merci à vous pour cet apprentissage accéléré de la culture belge tant linguistique que gustative ! Florette, il paraît que la France a annexé la Belgique ? ou l'inverse peut-être... ? =)*

*Je ne peux oublier de remercier les supers copains stéphanois ou plutôt ex-stéphanois. Fredo, ton projet d'annexion de la Belgique est en bonne voie, contente d'avoir pu y contribuer ! Un grand merci pour ces nombreuses soirées stéphanoises et ces parties de molkky endiablées à Cicogna. Comme quoi, un cours d'anglais peut être à l'origine d'une grande aventure. Caro, le service est vide sans toi, surtout les vendredis après-midi... Grâce à toi j'ai fait plusieurs sauts dans le vide, promis on pourra bientôt sauter ensemble. Mais pour ça tu vas être obligée de perfectionner ton accent d'africaine québécoise pour venir me voir !*

*Les amis nantais, même s'il a été difficile de vous voir durant ces 3 années, vous avez toujours été là. Après tout c'est avec vous que tout a commencé, Aurore, Mathilde, Max, Amélie et les coloc Lauraline, Lucile et Margaux. Nantes est loin, vous m'avez manqué. Justine, Cyrielle,*

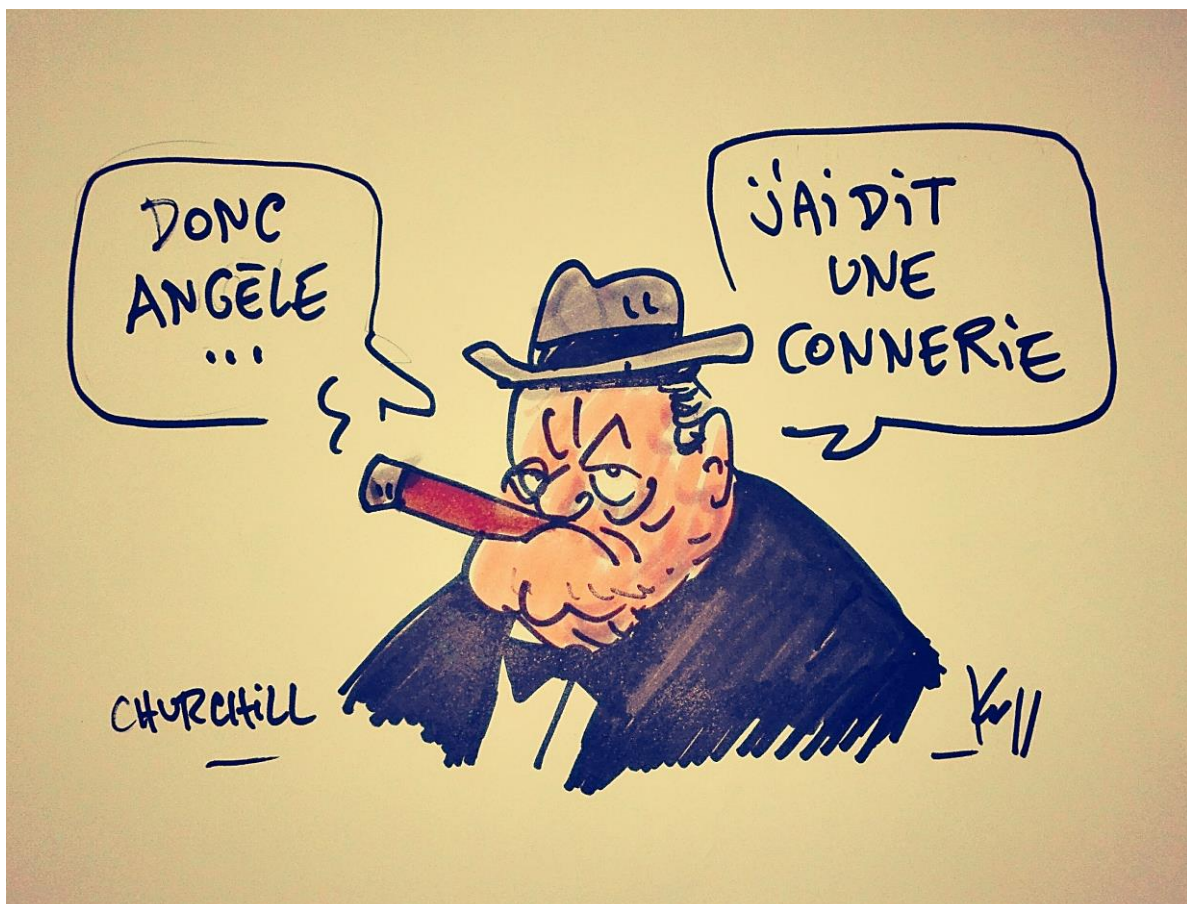


*Simon, nous nous connaissons depuis longtemps et quelle que soit la distance qui nous séparent, vous avez toujours été à mes côtés, merci !*

*Un merci tout particulier à **Clément**. Tu es de loin la plus belle surprise de cette thèse. Merci de m'avoir soutenue, écoutée et encouragée au quotidien, même lorsque je n'étais pas de très bonne humeur... Merci pour tous ces moments passés ensemble, pour avoir toujours été à mes côtés, mais surtout merci pour ton amour. De nouvelles aventures dans le froid québécois nous attendent et cette aventure, la plus belle, ne fait que commencer... J'en profite pour remercier ma « **famille montagnarde** », merci de votre accueil si chaleureux et votre affection. Attention **Jean-Marie**, je progresse à vitesse grand V en pétanque !!!*

*Pour finir, j'aimerais particulièrement remercier **ma famille** pour m'avoir soutenue, encouragée et suivie où que j'aie durant ce long parcours universitaire. Grenade, Saint-Etienne, Louvain-la-Neuve, vous avez toujours été là ! **Mum, Dad**, c'est grâce à vous que j'en suis arrivé là aujourd'hui, un immense merci ne suffirait même pas... **Pauline, Tony**, bientôt votre vie sera chamboulée, la crevette arrive... Fière d'être tatate !! **Antoine**, pourquoi ne ferais-tu pas un photo-reportage sur des vers de terre dans un poulailler ? Je suis sûr que ça plairait à une certaine personne... **Mémé**, promis je reviendrai le plus souvent possible, ton merveilleux poulet patates va me manquer... **Claudine**, c'est toujours un plaisir de découvrir tes talents culinaires, je risque de te demander de nombreuses recettes avant de partir !! **Yves**, tu vas devenir mon 2<sup>ème</sup> relecteur officiel... Merci d'y avoir consacré autant de temps. En tout cas, l'aventure continue, je vous attends maintenant tous de l'autre côté de l'atlantique !*

*PS : Un dernier remerciement à **Pierre Kroll** (dessinateur et caricaturiste belge) pour avoir si bien résumé cette thèse...*



# TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS .....	8
LISTE DES TABLEAUX .....	9
LISTE DES FIGURES .....	10
PREFACE .....	12
REVUE DE LA LITTERATURE .....	15
<b>Chapitre 1 La drépanocytose .....</b>	<b>16</b>
<b>1. Rappels historiques, génétiques et épidémiologiques .....</b>	<b>17</b>
1.1. Découverte de la drépanocytose .....	17
1.2. Génétique .....	17
1.3. Apparition de la mutation et relation au paludisme .....	19
1.4. Epidémiologie.....	20
<b>2. Physiopathologie et conséquences cliniques associées.....</b>	<b>22</b>
2.1. Processus physiopathologique.....	22
2.1.1. Les hémoglobines normales et l'hémoglobine S.....	22
2.1.2. De la polymérisation de l'hémoglobine S à la falciformation des globules rouges.....	23
2.2. Conséquences physiopathologiques et présentation clinique du phénotype drépanocytaire .....	27
2.2.1. L'hémolyse et l'anémie hémolytique chronique .....	27
2.2.2. Microcirculation vasculaire et hémoglobine S : les crises vaso-occlusives	29
<b>3. Exercice physique et drépanocytose.....</b>	<b>32</b>
3.1. Facteurs de risques associés à l'exercice intense et/ou prolongé.....	32
3.2. Aptitude physique et réponses à l'exercice .....	33
3.3. Toutes les activités physiques doivent-elles, pour autant, être exclues ? .....	33
<b>4. Les traitements de la drépanocytose.....</b>	<b>34</b>
4.1. Prise en charge des complications aiguës.....	34
4.1.1. Crises vaso-occlusives.....	34
4.1.2. Syndrome thoracique aigu .....	35
4.2. Les traitements de fond.....	35
4.2.1. Programme transfusionnel ou échange transfusionnel .....	35
4.2.2. Hydroxycarbamide .....	36
4.2.3. GBT440 ou voxelotor, un traitement prometteur.....	36
4.2.4. Greffe de cellules souches hématopoïétiques .....	37
<b>Chapitre 2 Le muscle strié squelettique.....</b>	<b>38</b>
<b>1. Organisation structurale et propriétés fonctionnelles.....</b>	<b>39</b>
1.1. Structure du muscle et de la fibre musculaire .....	39
1.2. Les différentes étapes de la contraction musculaire .....	41
1.3. Typologie des fibres musculaires .....	42
<b>2. Réseau vasculaire et microvasculaire .....</b>	<b>44</b>
2.1. Artères et artérioles .....	46
2.1.1. Composition des parois des artères et des artérioles .....	46
2.1.2. Les mécanismes de régulations de la répartition du débit sanguin .....	47

2.2.	Capillaires .....	49
2.3.	Veinules et veines .....	50
2.4.	L'angiogénèse.....	51
2.5.	Étude de la microvascularisation du muscle.....	53
<b>3.</b>	<b>Le métabolisme énergétique .....</b>	<b>55</b>
3.1.	La filière anaérobie alactique.....	56
3.2.	La voie anaérobie lactique : glycogénolyse et glycolyse.....	57
3.2.1.	Le système glycolytique .....	57
3.2.2.	Devenir de l'acide lactique .....	60
3.3.	La voie aérobie.....	62
3.3.1.	La glycolyse aérobie .....	62
3.3.2.	La lipolyse et la $\beta$ -oxydation .....	64
3.3.3.	La chaîne respiratoire mitochondriale.....	65
3.3.4.	Synthèse et interactions des voies métaboliques .....	67
<b>4.</b>	<b>Capacités de remodelages et d'adaptations du tissu musculaire .....</b>	<b>69</b>
4.1.	Le potentiel régénératif : rôle et étude des cellules satellites .....	69
4.2.	Adaptations du tissu musculaire en réponse à un entraînement aérobie .....	72
4.2.1.	Adaptations musculaires .....	73
4.2.2.	Adaptations microvasculaires.....	73
4.2.3.	Adaptations métaboliques .....	74
<b>Chapitre 3 Répercussions musculaires et fonctionnelles de la drépanocytose .....</b>		<b>77</b>
<b>OBJECTIFS ET HYPOTHESES DE RECHERCHE .....</b>		<b>89</b>
1.	<b>Objectifs de la thèse .....</b>	<b>90</b>
2.	<b>Hypothèses de recherches.....</b>	<b>91</b>
2.1.	Etude 1 : Bénéfices microvasculaires.....	91
2.2.	Etude 2 : Bénéfices structuraux et énergétiques .....	92
2.3.	Etude 3 : Réponse et rôle du potentiel régénératif musculaire.....	92
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>		<b>94</b>
1.	<b>Population étudiée .....</b>	<b>95</b>
2.	<b>Design expérimental .....</b>	<b>96</b>
2.1.	Exercice incrémental sous-maximal .....	96
2.2.	Protocole d'entraînement en endurance .....	97
2.3.	Biopsie musculaire .....	100
3.	<b>Analyse du tissu musculaire .....</b>	<b>101</b>
3.1.	Analyses histologiques.....	101
3.1.1.	Analyse de la morphométrie et de la typologie des fibres .....	101
3.1.2.	Analyse du réseau microvasculaire .....	103
3.1.3.	Analyse histochimique de l'activité COx .....	104
3.1.4.	Technique histochimique combinée COx/SDH.....	105
3.1.5.	Analyse du potentiel régénératif .....	105
3.2.	Mesure des activités enzymatiques en spectrométrie.....	108
3.3.	Analyse des contenus protéiques musculaires par western blot.....	109
<b>ARTICLE PRINCEPS .....</b>		<b>110</b>
<b>CONTRIBUTION PERSONNELLE .....</b>		<b>122</b>
<b>ÉTUDE 1 .....</b>		<b>123</b>

<b>ADAPTATIONS DU RESEAU MICROVASCULAIRE DU TISSU MUSCULAIRE DES PATIENTS DREPANOCYTAIRES EN REPONSE A L'ENTRAINEMENT EN ENDURANCE.....</b>	<b>123</b>
<b>ÉTUDE 2.....</b>	<b>150</b>
<b>ADAPTATIONS STRUCTURALES ET ENERGETIQUES DU TISSU MUSCULAIRE DES PATIENTS DREPANOCYTAIRES EN REPONSE A L'ENTRAINEMENT EN ENDURANCE.....</b>	<b>150</b>
<b>ÉTUDE 3.....</b>	<b>183</b>
<b>REPONSES DU POTENTIEL REGENERATIF MUSCULAIRE DU PATIENT DREPANOCYTAIRE SUITE A L'ENTRAINEMENT EN ENDURANCE .....</b>	<b>183</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>207</b>
<b>1. Conclusion.....</b>	<b>208</b>
<b>2. Perspectives .....</b>	<b>210</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>234</b>
<b>1. Publications, communications, prix et bourses.....</b>	<b>235</b>
<b>2. Fiches méthodologiques .....</b>	<b>237</b>

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADN</b> : acide désoxyribonucléique	<b>HSL</b> : lipases hormono-sensibles
<b>ADP</b> : adénosine diphosphate	<b>INRA</b> : institut national de la recherche agronomique
<b>AMP</b> : adénosine monophosphate	<b>LC</b> : longueur des capillaires au contact d'une fibre
<b>ATGL</b> : triglycérides lipases	<b>LC/PF</b> : longueur des capillaires au contact d'une fibre/périmètre de la fibre
<b>ATP</b> : adénosine triphosphate	<b>LDH</b> : lactate déshydrogénase
<b>BiiGC</b> : laboratoire de biologie, ingénierie et imagerie de la cornée	<b>LIBM</b> : laboratoire interuniversitaire de biologie de la motricité
<b>BSA</b> : albumine de sérum bovin	<b>MCT</b> : transporteur de monocarboxylate
<b>C/F</b> : capillary to fiber ratio	<b>Mfn2</b> : mitofusin-2
<b>CA</b> : anhydrase carbonique	<b>MHC</b> : chaînes lourdes de myosines
<b>CAF</b> : nombre de capillaires au contact d'une fibre musculaire	<b>MK</b> : myokinase
<b>CAFA</b> : CAF/surface de la fibre musculaire	<b>MRF</b> : facteur de régulation myogénique
<b>CapTor</b> : tortuosité Capillaire (capillary tortuosity)	<b>Na<sup>+</sup></b> : ion sodium
<b>CD</b> : densité capillaire	<b>NAD</b> : nicotinamine adénine dinucléotide
<b>CFPE</b> : capillary-to-fiber-perimeter exchange ratio	<b>NAD<sup>+</sup></b> : nicotinamine adénine dinucléotide oxydé
<b>CI</b> : complexe I de la chaîne respiratoire	<b>NADH</b> : nicotinamine adénine dinucléotide réduit
<b>CII</b> : complexe II de la chaîne respiratoire	<b>NBC</b> : co-transporteur sodium/bicarbonate
<b>CIII</b> : complexe III de la chaîne respiratoire	<b>NHE1</b> : échangeur sodium/proton
<b>CIV</b> : complexe IV de la chaîne respiratoire	<b>NO</b> : monoxyde d'azote
<b>CK</b> : créatine kinase	<b>OPA1</b> : optic atrophy type 1
<b>CO<sub>2</sub></b> : dioxyde de carbone	<b>P<sub>50</sub></b> : pression partielle en oxygène pour laquelle l'hémoglobine est saturée à 50 % d'oxygène
<b>CoA</b> : coenzyme-A	<b>PCr</b> : phosphocréatine
<b>CoQ</b> : coenzyme-Q	<b>PDGF</b> : platelet-derived growth factor
<b>COx</b> : cytochrome c oxidase	<b>PF</b> : périmètre d'une fibre musculaire
<b>CS</b> : citrate synthase	<b>PFK</b> : phosphofructokinase
<b>CV</b> : complexe V de la chaîne respiratoire	<b>PGC1<math>\alpha</math></b> : peroxisome proliférateur activé par le récepteur gamma coactivateur 1- $\alpha$
<b>DCPIP</b> : 2,6-dichlorophénol-indophénol	<b>Pi</b> : phosphate inorganique
<b>DO</b> : densité optique	<b>pKa</b> : constante d'acidité
<b>DRP1</b> : dynamin-related protein 1	<b>ROS</b> : reactive oxygen species
<b>DTNB</b> : 5,5' dithiobis 2 nitrobenzoic acid	<b>SDH</b> : succinate déshydrogénase
<b>ENO</b> : énalase	<b>SpO<sub>2</sub></b> : saturation pulsée en oxygène
<b>ExDre</b> : exercice dans la drépanocytose	<b>Tfam</b> : facteur de transcription mitochondrial A
<b>FADH<sub>2</sub></b> : flavine adénine dinucléotide réduit	<b>VEGF</b> : vascular endothelial growth factor
<b>FGF</b> : fibroblast growth factor	<b>VO<sub>2max</sub></b> : consommation maximale d'oxygène
<b>Fis1</b> : mitochondrial fission 1 protein	<b><math>\beta</math>-HAD</b> : $\beta$ -hydroxyacyl-coa-déshydrogénase
<b>G-1-P</b> : glucose-1-phosphate	
<b>G-6-P</b> : glucose-6-phosphate	
<b>GLUT4</b> : transporteur du glucose type 4	
<b>H<sup>+</sup></b> : proton	
<b>H<sub>2</sub>O</b> : molécule d'eau	
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> : ions bicarbonate	
<b>Hémoglobine A</b> : hémoglobine normale	
<b>Hémoglobine F</b> : hémoglobine fœtale	
<b>Hémoglobine S</b> : hémoglobine mutée pour la drépanocytose	
<b>HK</b> : hexokinase	
<b>HLA</b> : human leukocyte antigen	

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b> Répartition des différentes hémoglobines observées par électrophorèse.....	23
<b>Tableau 2 :</b> Caractéristiques contractiles, métaboliques et morphologiques moyennes des différents types de fibres du muscle strié squelettique chez l'Homme. ....	44
<b>Tableau 3 :</b> Synthèse des adaptations du tissu musculaire et de l'aptitude physique après un entraînement en endurance. ....	76
<b>Tableau 4 :</b> Synthèse des répercussions de la drépanocytose au niveau du tissu musculaire et de sa fonction.....	79
<b>Tableau 5 :</b> Interprétation des différents types de fibres.....	103
<b>Tableau 6 :</b> Synthèse des adaptations musculaires tissulaires et fonctionnelles des patients drépanocytaires en réponse à l'entraînement en endurance. ....	209

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Mode de transmission autosomique récessif de la drépanocytose.....	18
<b>Figure 2</b> : Distribution géographique des haplotypes drépanocytaires et diffusion originelle de cette maladie.....	19
<b>Figure 3</b> : Distribution globale du gène de la drépanocytose (A) et de l'endémicité du paludisme (B).....	20
<b>Figure 4</b> : Nombre de naissances drépanocytaires dans chaque pays en 2015.....	21
<b>Figure 5</b> : Incidence de la drépanocytose en population générale en France métropolitaine en 2010. ....	22
<b>Figure 6</b> : Schéma de la falciformation des globules rouges induite par la polymérisation de l'hémoglobine S. ....	25
<b>Figure 7</b> : Courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine d'un sujet sain et d'un patient drépanocytaire. ....	27
<b>Figure 8</b> : Pathophysiologie de la drépanocytose et conséquences cliniques associées.....	32
<b>Figure 9</b> : Organisation hiérarchique du muscle squelettique. ....	39
<b>Figure 10</b> : Structure d'une fibre musculaire. ....	41
<b>Figure 11</b> : Représentation schématique de l'architecture vasculaire du muscle. ....	45
<b>Figure 12</b> : Représentation structurale et fonctionnelle de l'arbre artériel.....	48
<b>Figure 13</b> : Représentation de la tortuosité capillaire en 2D et 3D ainsi que l'ultrastructure d'un capillaire. ....	50
<b>Figure 14</b> : Comparaison histologique entre une artère et une veine. ....	51
<b>Figure 15</b> : Le processus d'angiogenèse par bourgeonnement et intussusception.....	52
<b>Figure 16</b> : Représentation de la méthode de calcul de l'indice CapTor. ....	54
<b>Figure 17</b> : Mesure des indices microvasculaires. ....	55
<b>Figure 18</b> : Voie anaérobie lactique de la glycogénolyse et de la glycolyse. ....	59
<b>Figure 19</b> : Représentation schématique des mécanismes de régulation du pH intramusculaire.....	62
<b>Figure 20</b> : Le cycle de Krebs.....	63
<b>Figure 21</b> : $\beta$ -oxydation ou hélice de Lynen .....	65
<b>Figure 22</b> : La chaîne respiratoire mitochondriale .....	67
<b>Figure 23</b> : Synthèse des voies métaboliques musculaires.....	68
<b>Figure 24</b> : Localisation et marqueurs moléculaires de la cellule satellite.....	72
<b>Figure 25</b> : Représentation schématique d'un programme myogénique en réponse à un stimulus anabolisant.....	72
<b>Figure 26</b> : Le cercle vicieux des répercussions de la drépanocytose.....	80
<b>Figure 27</b> : Patient drépanocytaire lors du test incrémental sous-maximal.....	97
<b>Figure 28</b> : Représentation schématique du protocole expérimentale.....	99
<b>Figure 29</b> : Biopsie musculaire d'une patiente drépanocytaire (à gauche) et image d'un extrait musculaire (à droite). ....	101
<b>Figure 30</b> : Montage en immunofluorescence de coupes sériées dédiées à l'analyse de la morphométrie et de la typologie des fibres musculaires. ....	102
<b>Figure 31</b> : Analyse des indices de microvascularisation.....	104
<b>Figure 32</b> : Histoenzymologie des activités COx (à gauche) et COx/SDH combinées (à droite). ....	105
<b>Figure 33</b> : Etude du potentiel régénératif musculaire à partir des lames sériées 1 et 2. ....	107
<b>Figure 34</b> : Etude du potentiel régénératif musculaire à partir des lames sériées 1 et 3. ....	108

**Figure 35** : Du cercle vicieux au cercle vertueux : schématisation des bénéfices liés à la pratique d'une activité physique adaptée chez le patient drépanocytaire. .... 210



# PREFACE

La drépanocytose est une hémoglobinopathie mono-mutationnelle de transmission autosomique récessive. C'est la maladie génétique la plus fréquente avec près de 5 millions de personnes touchées dans le monde et 200 millions en sont porteuses hétérozygotes. Par sa fréquence (certains pays d'Afrique centrale comptent jusqu'à 2% des nouveau-nés) et sa gravité, elle peut représenter un lourd problème de santé publique. En France, à la suite des migrations de ces derniers siècles, la drépanocytose est également la maladie génétique la plus fréquente avec près d'une naissance sur 2500. Cette pathologie est le résultat d'une mutation unique au niveau d'un gène codant pour la chaîne  $\beta$ -globine aboutissant à la synthèse d'une hémoglobine S anormale. En condition désoxygénée, cette hémoglobine S tend à polymériser, provoquant la falciformation des globules rouges (modification morphologique du globule rouge qui s'allonge et prend la forme d'une faucille). Une rigidité accrue et une déformabilité moindre caractérisent également ces globules rouges drépanocytaires favorisant ainsi leur enclavement dans les microvaisseaux sanguins avec comme conséquence la survenue de crises vaso-occlusives, particulièrement douloureuses. Ces crises peuvent être responsables de dysfonctionnements majeurs de bon nombre d'organes, pouvant engager le pronostic vital des patients. La fragilité de ces globules rouges est à l'origine d'une anémie hémolytique chronique et sévère pouvant entraîner une dysfonction endothéliale et des troubles vasculaires. Les principales manifestations cliniques de cette maladie potentiellement mortelle s'accompagnent aussi d'une intolérance à l'effort et d'altérations de la fonction et du tissu musculaire des patients. Un des facteurs de risque de falciformation des globules rouges est la réalisation d'un effort physique inhabituel intense et/ou prolongé. Etant donné les phénomènes physiologiques que celui-ci entraîne (acidose, phénomènes inflammatoires, activation endothéliale, stress oxydatif, etc), cet effort est susceptible de favoriser la polymérisation de l'hémoglobine, et par conséquent la survenue de crises vaso-occlusives. C'est dans ce contexte que l'activité physique, dans sa globalité, a longtemps été redoutée pour ces patients et proscrite sans que cela n'ait été véritablement étudié. Par principe de précaution, le patient drépanocytaire va ainsi adopter un profil d'ultra sédentaire susceptible d'accentuer son déconditionnement physique et musculaire. La potentialisation des mécanismes physiopathologiques de cette maladie par ce style de vie sédentaire entraîne donc les patients dans un cercle vicieux, dégradant d'autant plus leur qualité de vie.

Si l'activité physique est de plus en plus considérée comme un traitement adjuvant efficace dans diverses pathologies chroniques, sa mise en œuvre dans le contexte de la drépanocytose reste complexe. Malgré la contre-indication de l'exercice intense et/ou

prolongé, de récentes études ont montré la faisabilité et l'innocuité d'un exercice aigu d'intensité modérée. De même, certaines études ont rapporté des bénéfices au niveau de la fonction musculaire et sur le bien être des patients à la suite d'une période de physiothérapie. Dans ce contexte, la mise en place d'un programme d'activité physique adaptée, réalisé à une intensité modérée, apparaît comme une stratégie thérapeutique prometteuse. Une telle pratique serait susceptible d'améliorer les capacités musculaires, de diminuer les symptômes de la maladie et d'améliorer l'autonomie et la qualité de vie des patients drépanocytaires. Cependant, si des démarches rééducatives ponctuelles de ce type ont pu témoigner de la faisabilité de façon limitée, il reste toutefois nécessaire de définir un consensus sur les modalités pratiques de thérapie par l'exercice, en évaluant objectivement les risques, limites et bénéfices envisageables sur l'aptitude physique, la fonction et le tissu musculaire des patients drépanocytaires.

Dans ce contexte, l'objectif du projet Exercice dans la Drépanocytose (ExDre) est de proposer une étude contrôlée, randomisée, comparative, multicentrique et ouverte afin d'évaluer les effets d'un programme d'entraînement en endurance d'intensité modérée sur l'aptitude physique, le tissu et la fonction musculaire, ainsi que sur la qualité de vie des patients drépanocytaires. L'objectif de ce travail de thèse est plus spécifiquement focalisé sur l'analyse de l'impact de cet entraînement sur les caractéristiques du tissu musculaire des patients drépanocytaires.

Afin de dresser le cadre théorique des études expérimentales, une revue de littérature composée de 3 chapitres présentera : i) une description détaillée de la pathologie drépanocytaire, ii) un rappel des caractéristiques du tissu musculaire squelettique sain et iii) une analyse des répercussions musculaires et fonctionnelles observées dans cette pathologie ainsi que leurs impacts sur la vie quotidienne. Ce dernier chapitre sera composé d'une revue de littérature récemment publiée dans la revue *Medicine & Sciences in Sports & Exercise* qui s'intitule *How Sickle Cell Disease Impairs Skeletal Muscle Function: Implications in Daily Life*. Cette revue argumente l'intérêt d'une thérapie par l'exercice dans cette pathologie.

Ce cadre théorique sera suivi d'une partie « matériels et méthodes » décrivant la population sollicitée et expliquant les différentes techniques et méthodes d'analyses utilisées dans cette thèse. Les principaux résultats du projet ExDre seront ensuite présentés (article princeps, Gellen et al. 2018), suivis de la présentation des résultats expérimentaux de ce travail de thèse et s'inscrivant dans le cadre de ma contribution personnelle. Ces résultats expérimentaux et leurs commentaires seront présentés au travers de 3 études, chacune valorisée par un article scientifique, analysant l'impact de l'entraînement en endurance chez

les patients drépanocytaires sur le réseau microvasculaire (étude 1), sur les caractéristiques structurales et énergétiques (étude 2) et sur le potentiel régénératif (étude 3) de ce tissu musculaire. Une conclusion générale et des perspectives de travail viendront conclure ce manuscrit.

# **REVUE DE LA LITTERATURE**

# CHAPITRE 1

## LA DREPANOCYTOSE

*Ce chapitre présente une description détaillée de la pathologie étudiée dans cette thèse : la drépanocytose.*

*Par son histoire et son épidémiologie, par sa génétique et sa physiopathologie, par ses traitements actuels et ses avancées thérapeutiques, ce chapitre vise à faire un état des lieux des connaissances de la littérature sur ces thématiques.*

*Mutation monogénique, trouble multi-systémique, ce chapitre met avant tout en lumière la complexité de cette pathologie par l'action cumulative de ces effets physiopathologiques. Malgré d'importantes avancées scientifiques, la nécessité de trouver un traitement curatif ou adjuvant demeure plus que jamais d'actualité.*

# 1. Rappels historiques, génétiques et épidémiologiques

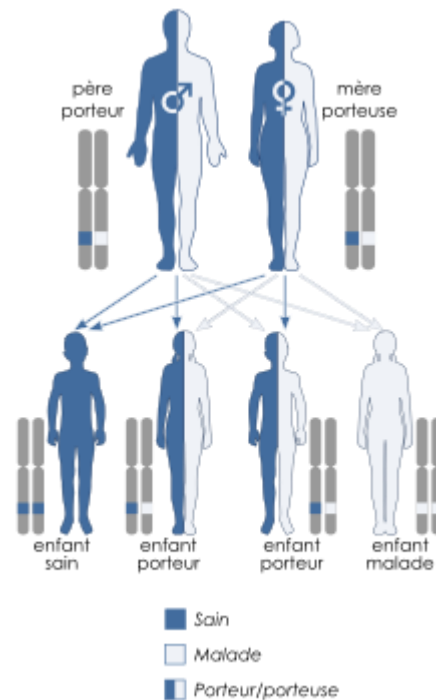
## 1.1. Découverte de la drépanocytose

Si les caractéristiques cliniques de la drépanocytose furent décrites pour la première fois en 1910 en Amérique du Nord (Herrick, 1910), la première description de cette maladie date de 1846 avec la publication d'une autopsie réalisée par le Dr Leiby d'un esclave fugitif dépourvu de rate (Leiby, 1846). Peu de temps après, en 1874, le Dr Africanus Horton décrit une « *rhumatic fever* » (rhumatisme de la saison froide, équivalent clinique de la drépanocytose), correspondant aujourd'hui à une crise vaso-occlusive osseuse, mais son travail passa inaperçu. C'est donc en 1910 que le Dr James B. Herrick identifie un signe phénotypique spécifique de la drépanocytose chez un patient antillais de 20 ans. L'examen biologique de ce patient a mis en évidence une anémie hémolytique chronique et des globules rouges rigides et déformés prenant la forme d'une faucille, d'où le nom anglophone de « *sickle cell anaemia/disease* » (Herrick, 1910) ou drépanocytose en français (du grec *drépanon* qui signifie faucille et *kutos* qui signifie cellule).

## 1.2. Génétique

La découverte par Linus Pauling et ses collaborateurs en 1949 de l'origine « moléculaire » de la drépanocytose lui valut le prix Nobel de Chimie (Pauling et al. 1949). Ses travaux sur la molécule d'hémoglobine (protéine des globules rouges assurant le transport de l'oxygène dans le sang) ont révélé une différence de migration électrophorétique entre l'hémoglobine normale d'un sujet sain (hémoglobine A) et celle d'un sujet drépanocytaire (hémoglobine anormale S résultant de la mutation drépanocytaire). L'hémoglobine S présentait une migration anormalement plus lente que l'hémoglobine A, ce qui traduisait une différence de charge entre les 2 molécules. La nature précise de l'altération conduisant à la formation de l'hémoglobine S fut ensuite précisée par le britannique Vernon Ingram en 1959 (Ingram, 1959). Il mit en évidence une mutation unique au niveau du deuxième nucléotide du 6<sup>ème</sup> codon du gène codant pour la chaîne  $\beta$ -globine. La mutation résulte en un polymorphisme nucléotidique où une thymine est remplacée par une adénine (T→A) conduisant, au niveau protéique, à la substitution de l'acide glutamique par une valine au niveau du chromosome 11 ( $\beta$ GLU→VAL) (Ingram, 1959). Cette mutation monogénique entraîne la formation d'une hémoglobine S. En 1933, les travaux de Lemuel Diggs et ses collaborateurs ont, pour la première fois, décrit les 2 formes cliniques de la maladie : une forme sévère et une forme pauci-symptomatique (Diggs et al. 1933). C'est en 1949 que James Neel compléta ces informations en établissant les propriétés génétiques de la maladie sous l'existence d'une forme homozygote et hétérozygote

en confirmant l'hypothèse d'une transmission mendélienne autosomique récessive (Neel, 1949) (Figure 1).



**Figure 1 : Mode de transmission autosomique récessif de la drépanocytose.**

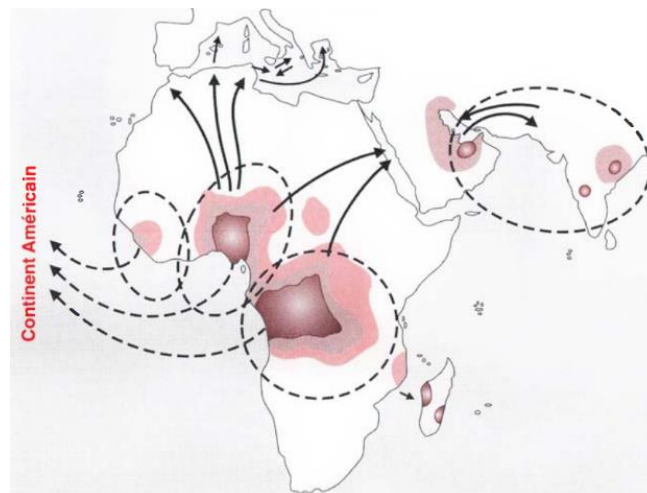
Chaque enfant reçoit un allèle du père et un allèle de la mère afin de produire une chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine. Si des parents hétérozygotes transmettent chacun un allèle où le gène de l'hémoglobine est normal, l'enfant (garçon ou fille) sera sain et de génotype AA. A l'inverse, si chacun de ses parents transmettent tous les 2 l'allèle muté, l'enfant (garçon ou fille) sera malade et produira donc une hémoglobine  $\beta$  anormale, l'hémoglobine S, il sera alors de génotype SS. Enfin, si un seul des parents transmet un allèle muté, l'enfant produira à la fois de l'hémoglobine normale et de l'hémoglobine S, il sera comme ses parents, hétérozygote (porteur sain), donc de génotype AS.

Les individus hétérozygotes, possédant un gène codant pour l'hémoglobine normale  $\beta^A$  et un gène codant pour l'isoforme mutée  $\beta^S$ , sont porteurs du trait drépanocytaire (*sickle cell trait* en anglais) et de génotype AS, ils sont considérés comme « asymptomatiques ». Cette notion « d'asymptomatique » est cependant sujette à débat, car les sujets hétérozygotes peuvent être parfois soumis à des complications sévères (rhabdomyolyse, mort subite) notamment lors de la pratique d'une activité physique intense (Kark et al. 1987 ; Tsaras et al. 2009). Lors de ce type d'activité, ils peuvent également être exposés au stress oxydatif, à de l'inflammation, et aux désordres hémorhéologiques (Connes et al. 2006 ; Tripette et al. 2010 ; Chirico et al. 2012). Les sujets homozygotes possèdent 2 gènes codant pour l'isoforme mutée  $\beta^S\beta^S$ . L'état homozygote est la forme la plus sévère de cette pathologie mais d'autres allèles des gènes  $\beta$  de l'hémoglobine peuvent s'associer à l'hémoglobine S et induire un syndrome drépanocytaire majeur :  $\beta^S\beta^C$ ,  $\beta^S\beta_0$  thalassémie et  $\beta^S\beta^+$  thalassémie. Les patients inclus dans les études de cette thèse sont uniquement des patients drépanocytaires homozygotes  $\beta^S\beta^S$  ou  $\beta^S\beta_0$  thalassémie, présentant donc des formes sévères de la drépanocytose. C'est pourquoi

les formes hétérozygotes, ainsi que les formes modérées de la pathologie, ne seront pas davantage détaillées dans ce manuscrit.

### 1.3. Apparition de la mutation et relation au paludisme

La mutation drépanocytaire est associée à 5 haplotypes qui, désignés d'après leur épïcentre, pourraient indiquer une apparition simultanée de la mutation dans 5 régions géographiques différentes. On distingue 4 haplotypes africains : Centrafrique ou Bantou, Cameroun, Sénégal et Bénin et un haplotype arabo-indien (Figure 2).



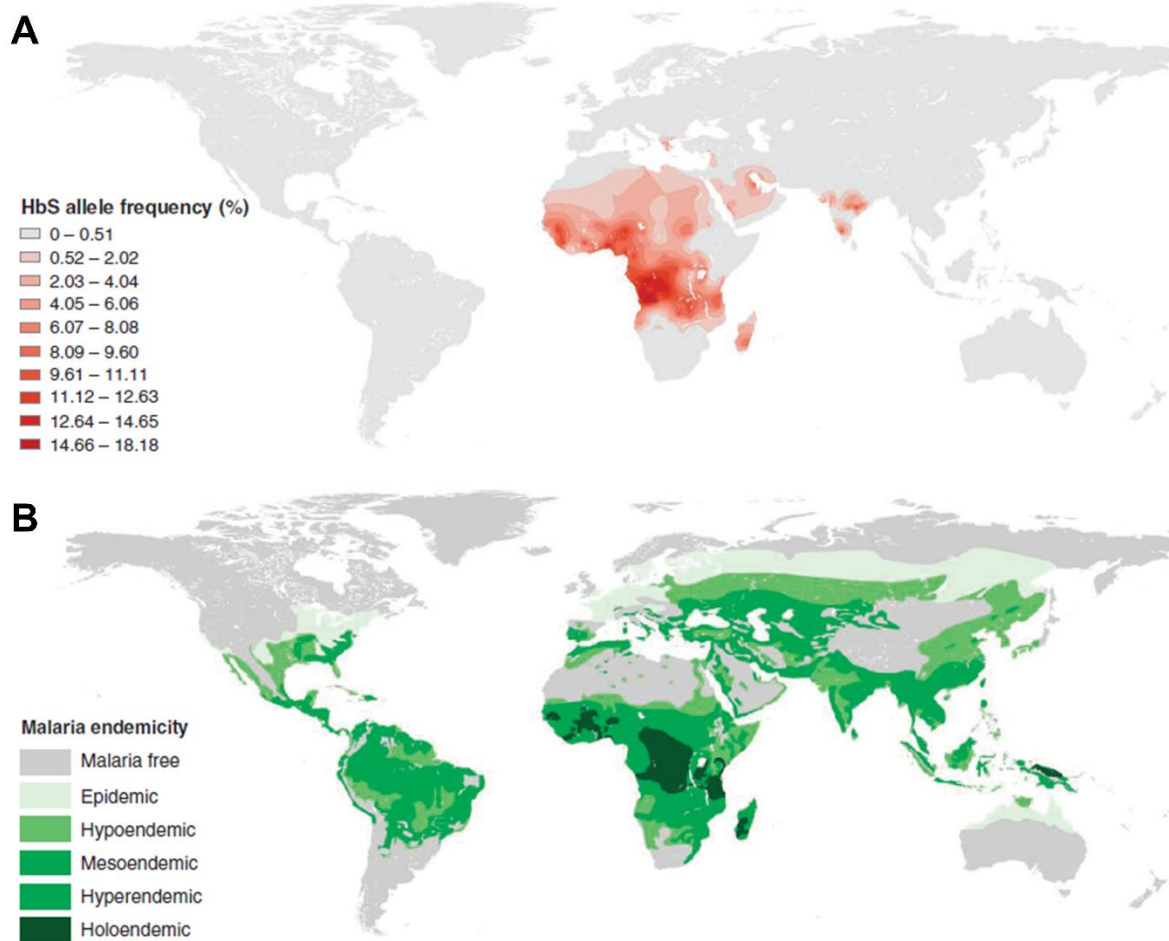
**Figure 2 : Distribution géographique des haplotypes drépanocytaires et diffusion originelle de cette maladie.**

Les intensités décroissantes de coloration correspondent à des fréquences géniques décroissantes. Toutes les régions de fréquence majeure sont aussi des zones d'endémie palustre. Une fréquence d'hétérozygotes dépassant 25-30% n'est observée que dans les pays du golfe du Bénin et en Afrique centrale. Dans les foyers sénégalais et arabo-indiens la fréquence génique reste légèrement inférieure. Les migrations ont été marquées par des flèches. Les lignes discontinues représentent des migrations forcées vers le continent américain. Extraite Labie & Elion (1995).

L'apparition de ces haplotypes en divers points du globe est majoritairement retrouvée en zone endémique où sévit le paludisme. En effet, l'hypothèse de Haldane en 1949 (Haldane, 1949) s'appuie sur la superposition des cartes géographiques représentant la fréquence de la drépanocytose et du paludisme. Il propose l'hypothèse que les individus hétérozygotes situés dans les pays méditerranéens confèrent un avantage sélectif contre l'infection à *Plasmodium falciparum* (parasite transmis par l'anophèle femelle et responsable des formes les plus graves du paludisme). Cette pression de sélection, appelée communément *malaria hypothesis*, a été confirmée par la suite en Afrique avec une relation trouvée entre l'hémoglobine S et le paludisme (Allison, 1954). Des études *in vitro* et *in vivo* ont également confirmé le rôle protecteur de l'hémoglobine S contre le paludisme (Min-Oo & Gros 2005 ; Williams, 2006). Récemment, l'étude de Piel et al. (2010) confirme cette hypothèse à l'échelle mondiale (Figure 3). Ainsi, l'héritage d'un seul gène confère une protection contre le paludisme (forme



hétérozygote) alors que l'héritage de 2 gènes (forme homozygote) conduit à la drépanocytose et n'apporte pas une telle protection. Le paludisme représente d'ailleurs une cause majeure de mauvaise santé et de décès chez les enfants atteints de drépanocytose.



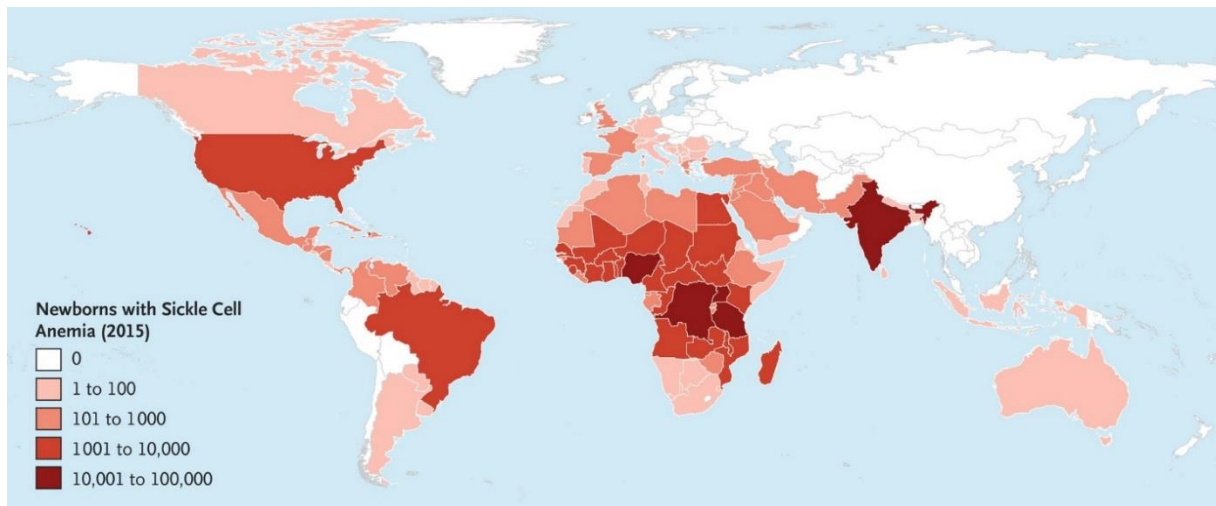
**Figure 3 : Distribution globale du gène de la drépanocytose (A) et de l'endémicité du paludisme (B).**

Extraite et adaptée de Piel et al. (2010).

#### 1.4. Epidémiologie

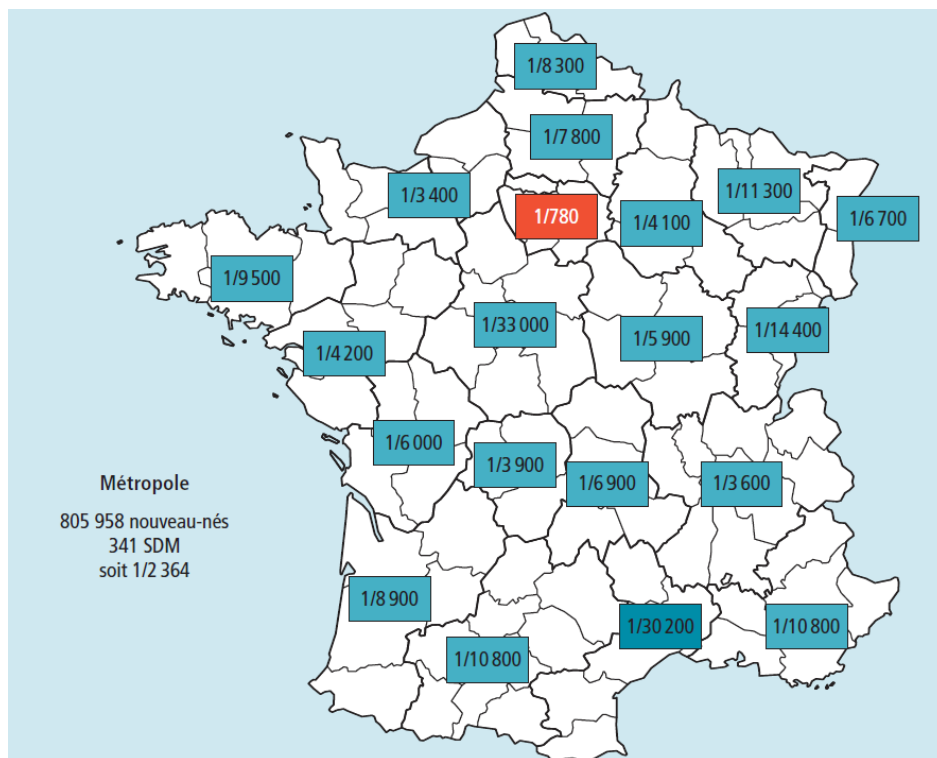
La prévalence de la drépanocytose est très hétérogène en fonction des régions du monde. Celle-ci est particulièrement élevée en zone endémique où sévit le paludisme : régions d'Afrique sub-saharienne, pourtour du bassin méditerranéen, indienne. Cependant, la distribution de cette maladie s'est répandue bien au-delà de ses zones d'origines en raison de l'esclavage et des mouvements migratoires de ces derniers siècles, notamment en Europe, aux Antilles, en Amérique du Nord et du Sud. Les rapports de l'organisation mondiale de la santé estiment qu'environ 120 millions de personnes sont porteuses du trait drépanocytaire (soit 5% de la population mondiale), ce pourcentage pouvant atteindre 25% dans certaines régions du monde. Les résultats de ce rapport estiment également à 5 millions le nombre de personnes atteintes du syndrome drépanocytaire majeur, comprenant la forme homozygote et

les formes hétérozygotes composites. Chaque année, environ 300 000 naissances présentant un syndrome drépanocytaire majeur sont recensées dont 200 000 sur le territoire africain. En 2015, la grande majorité de ces naissances ont eu lieu dans 3 pays : le Nigéria, la République Démocratique du Congo et l'Inde (Figure 4). Si cette maladie est considérée comme une maladie rare, puisqu'elle concerne moins d'une naissance sur 2000 à l'échelle de la population mondiale, dans certaines régions du monde la proportion d'homozygotes et d'hétérozygotes est si importante qu'elle représente une véritable préoccupation de santé publique.



**Figure 4 : Nombre de naissances drépanocytaires dans chaque pays en 2015.**  
Données extraites de Piel et al. (2017).

En France, c'est également la maladie génétique la plus fréquente, avec en moyenne 300 naissances par an d'enfants ayant un syndrome drépanocytaire majeur et 12 000 naissances d'hétérozygotes (Galactéros, 1996). L'incidence moyenne de la drépanocytose en métropole est de 1/2364 en 2010, les 3/4 des malades étant concentrés en Ile-de-France (bulletin épidémiologique hebdomadaire 2012) (Figure 5). La population des patients drépanocytaires résidant en Ile-de-France est l'objet des études réalisées dans ce manuscrit. La drépanocytose a été reconnue comme une priorité de santé publique par l'Organisation Mondiale de la Santé en 2004 et par l'Organisation des Nations Unies en 2008 (bulletin épidémiologique hebdomadaire 2015).



**Figure 5 : Incidence de la drépanocytose en population générale en France métropolitaine en 2010.**

Extraite du Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire (Juillet 2012).

## 2. Physiopathologie et conséquences cliniques associées

### 2.1. Processus physiopathologique

Suite aux travaux de Pauling et de ses collaborateurs sur l'hémoglobine S (Pauling et al. 1949) et d'Ingram sur la mutation génétique (Ingram, 1956), un schéma complet du processus de falciformation de l'hémoglobine S a été proposé par Bunn en 1997 (Bunn, 1997).

#### 2.1.1. Les hémoglobines normales et l'hémoglobine S

L'hémoglobine est une métalloprotéine des globules rouges assurant le transport de l'oxygène dans le sang. Le globule rouge, ou érythrocyte (du grec *erythros* : rouge et *kutos* : cellule) est une cellule normalement discoïde biconcave et dotée d'une extrême souplesse qui lui permet de circuler dans des capillaires de diamètre inférieur au sien. La molécule d'hémoglobine, située dans le cytoplasme du globule rouge, transporte l'oxygène vers les tissus de l'organisme. L'hémoglobine humaine est une molécule tétramérique composée de 4 chaînes polypeptidiques de globines identiques 2 à 2, associées à 4 molécules d'hèmes situées dans une poche hydrophobe. L'hème est une protéine solidement fixée à chacune des

chaînes de globine et contient un atome de fer qui possède la propriété de fixer l'oxygène de façon réversible : **désoxyhémoglobine + oxygène  $\rightleftharpoons$  oxyhémoglobine.**

Une hémoglobine peut lier jusqu'à 4 molécules d'oxygène. Chez l'adulte sain, il existe différentes sous-unités de globine ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ ) qui, associées entre elles, forment 3 types d'hémoglobines présentes en plus ou moins grandes quantités (Widmaier et al. 2008) :

- L'hémoglobine A est présente en grande quantité et possède 2 sous-unités  $\alpha$  et 2 sous-unités  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ).
- L'hémoglobine A<sub>2</sub> est présente en faible quantité (environ 2,5%) et possède 2 sous-unités  $\alpha$  et 2 sous-unités  $\delta$  ( $\alpha_2\delta_2$ ).
- L'hémoglobine fœtale (F) est présente en très faible quantité (<1%) et possède 2 sous-unités  $\alpha$  et 2 sous-unités  $\gamma$  ( $\alpha_2\gamma_2$ ). A la naissance, l'hémoglobine F représente le constituant hémoglobinique principal avec un taux de 90%.

Chez l'homme, la concentration d'hémoglobine se situe entre 12 et 18 g/dL et la quantité d'hémoglobine contenue dans 100 mL d'hématies (concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, CCMH) est comprise entre 32 et 36 g/dL.

La mutation drépanocytaire entraîne la formation d'une hémoglobine S qui possède 2 sous-unités  $\alpha$  et 2 sous-unités  $\beta^S$  ( $\alpha_2\beta^S_2$ ). Les patients ayant un syndrome drépanocytaire majeur présentent une grande quantité de cette hémoglobine S (80-95%) alors que les patients hétérozygotes de génotype AS en présentent une plus faible quantité (30-40%) (Ware et al. 2017). Les patients ayant un syndrome drépanocytaire majeur présentent également un pourcentage relativement important d'hémoglobine F (5-15%). La répartition de ces différents types d'hémoglobines est synthétisée dans le Tableau 1.

**Tableau 1: Répartition des différentes hémoglobines observées par électrophorèse.**

	Hémoglobine A (%)	Hémoglobine S (%)	Hémoglobine F (%)	Hémoglobine A <sub>2</sub> (%)	Forme clinique
<b>Sain</b>	95-98	0	<1	<3-5	-
<b>Porteurs du trait</b>					
Hétérozygote, AS	55-65	30-40	<1	<3-5	Bénin
<b>Formes sévères</b>					
Drépanocytose homozygote	0	80-95	5-15	<3-5	Sévère
S/ $\beta^0$ thalassémie	0	80-90	5-15	>3-5	Sévère

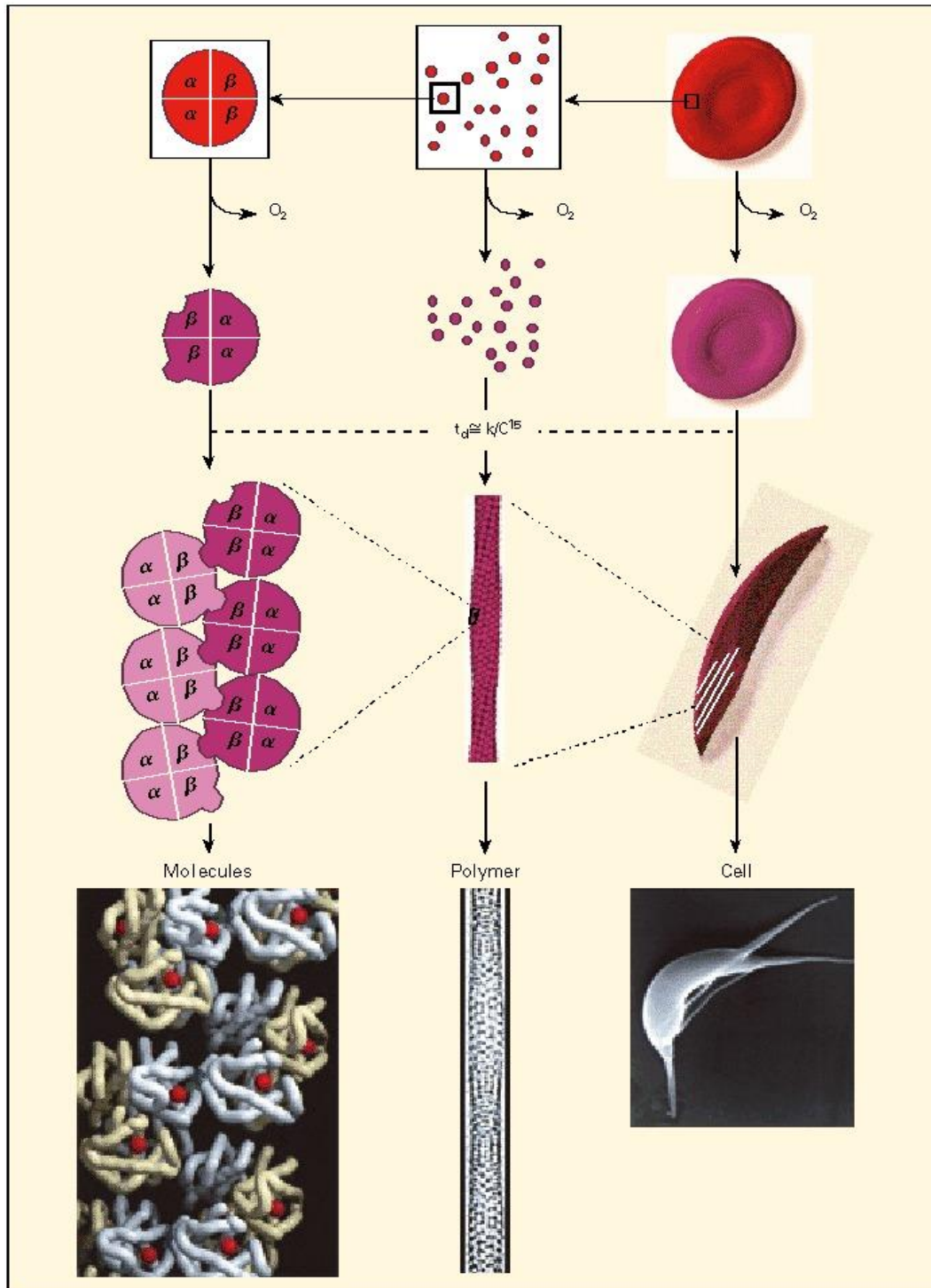
Extrait et modifié de Ware et al. (2017).

### 2.1.2. De la polymérisation de l'hémoglobine S à la falciformation des globules rouges

L'hémoglobine S se distingue de l'hémoglobine A par une mobilité électrophorétique plus faible, mais surtout par sa plus faible solubilité dans sa forme désoxygénée. Au cours de la désoxygénation qui suit le passage dans la microcirculation, l'hémoglobine S subit un changement de conformation susceptible de provoquer sa polymérisation. Cette particularité

s'explique par un changement de charge et de polarité de l'hémoglobine S dû à la substitution de l'acide glutamique par une valine. En effet, alors que l'acide glutamique est un acide aminé chargé négativement et hydrophile, la valine est un acide aminé non chargé et hydrophobe. La valine établit des liaisons hydrophobes avec d'autres résidus hydrophobes sur la chaîne  $\beta$  d'une autre désoxyhémoglobine S adjacente et, en particulier, avec la phénylalanine  $\beta$ 85 et la leucine  $\beta$ 88 (Vekilov, 2007). Une seule des 2 valines opère ce contact, de sorte que l'interaction  $\beta$ - $\beta$  entraîne la formation d'un polymère représenté comme un enchaînement de 2 rangées de molécules. Le polymère se forme et s'allonge en 14 fibres hélicoïdales qui se regroupent et se rigidifient entraînant la falciformation du globule rouge en forme de faucille (Bunn, 1997). Ce globule rouge présente alors une rigidité accrue et une déformabilité moindre. Ce processus de polymérisation génère des dommages au niveau du cytosquelette et de la membrane érythrocytaire. Cependant, ce processus est réversible et sous l'effet d'une réoxygénation, le globule rouge peut reprendre sa forme initiale. Par ailleurs, après plusieurs cycles de désoxygénation-réoxygénation, les dommages augmentent et le processus de polymérisation de l'hémoglobine S devient irréversible, donnant lieu à la formation d'un globule rouge définitivement déformé. Ces globules rouges sont nommés drépanocytes et sont caractéristiques du sang veineux des patients drépanocytaires (Bunn, 1997) (Figure 6).

Le processus de polymérisation de l'hémoglobine S met toujours un certain temps à s'amorcer, on parle de *delay time*. Cette notion a été introduite en 1974 par Hofrichter et ses collaborateurs (Hofrichter et al. 1974) et correspond au temps de latence nécessaire à l'hémoglobine S pour polymériser. Ce temps est inversement proportionnel, à une puissance élevée, à la concentration intracellulaire de l'hémoglobine. Cela signifie que plus la concentration intra-érythrocytaire en hémoglobine S est importante, plus les globules rouges auront tendance à falciformer (Hofrichter et al. 1974, Labie & Elion, 2005 ; Rees et al. 2010). Certaines conditions sont susceptibles de favoriser la polymérisation de l'hémoglobine S. Les facteurs les plus fréquents sont : l'élévation de la température (Hofrichter et al. 1974), l'acidose (Ueda & Bookchin, 1984), l'hypoxie (Bessis & Delphech, 1982), la déshydratation cellulaire (Ueda & Bookchin, 1984) et une augmentation du taux de 2,3 DiPhosphoGlycérate (Ueda & Bookchin, 1984). Cependant, la présence d'hémoglobine A ou d'hémoglobine F restreint ce processus de polymérisation (Adachi & Asakura, 1984 ; Steinberg & Embury, 1986).



**Figure 6 : Schéma de la falciformation des globules rouges induite par la polymérisation de l'hémoglobine S.**

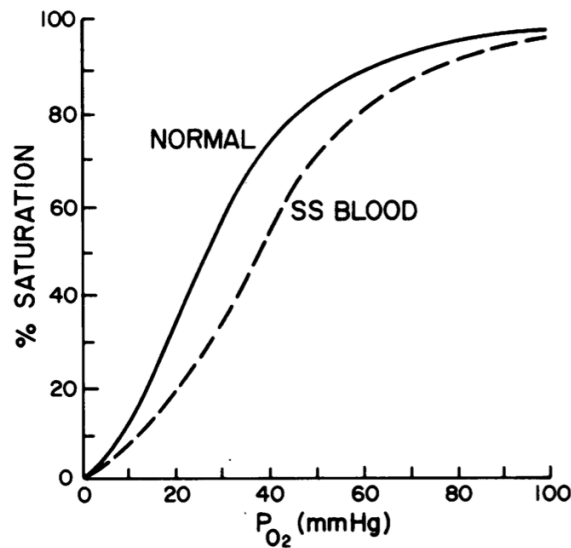
Lorsque que les globules rouges traversent la microcirculation, l'oxygène est libéré de l'oxyhémoglobine (rond rouge) générant de la désoxyhémoglobine (rond violet). En haut à gauche de la figure, le schéma représente l'hémoglobine S ( $\alpha_2\beta_2$ ). La désoxygénation de l'hémoglobine S induit un changement de conformation de la molécule. Le site hydrophobe, représenté ici par une protubérance, peut se lier à un autre site hydrophobe d'une autre molécule d'hémoglobine S. Cette interaction est nécessaire à la constitution du polymère, représenté ici par l'interaction de 3 molécules de désoxyhémoglobine S (violet foncé) avec 3 autres molécules de désoxyhémoglobine S (violet clair). En bas à gauche, un modèle à haute résolution, préparé par les Drs Josephs, Watowich et Gross, montre l'interaction de 2 rangées composées de 3 désoxyhémoglobine S. Les sous-unités  $\alpha$  sont représentées en jaune pâle et les sous-

unités  $\beta$  en gris. Les groupes hèmes sont représentés par des ronds rouges. Le dessin du milieu montre l'assemblage de la désoxyhémoglobine S en une fibre hélicoïdale à 14 rangées, représentée sous la forme d'une corde torsadée. L'équation, présentée au milieu du schéma, mesure le temps, *delay time* ( $t_d$ ), entre la désoxygénation de l'hémoglobine S et la constitution du polymère. Le  $t_d$  est inversement proportionnel à la concentration intracellulaire de l'hémoglobine puissance 15 ( $C^{15}$ ) ; k représente une constante expérimentale. La photographie du bas est une micrographie électronique à haute résolution d'une fibre, fournie par le Dr Stuart Edelstein. Au fur et à mesure que la désoxyhémoglobine S se polymérise et que les fibres s'alignent, le globule rouge se déforme prenant la forme d'une faucille. La photo en bas de page à droite, fournie par le Dr James White, présente une micrographie électronique à balayage d'un globule rouge réversible. Extraite de Bunn (1997).

Le processus de polymérisation de l'hémoglobine S va également influencer son affinité pour l'oxygène (Bessis & Delpech, 1982). En condition normale, l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène est dépendante de sa saturation en oxygène. L'hémoglobine se lie avec l'oxygène selon un procédé allostérique, la courbe d'affinité de l'oxygène pour l'hémoglobine prend alors une allure sigmoïdale. La pression partielle en oxygène pour laquelle l'hémoglobine est saturée à 50 % d'oxygène est appelée  $P_{50}$  : plus sa valeur est faible, plus l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène est élevée. Dans le cas de la drépanocytose, la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine est nettement décalée vers la droite (Becklake et al. 1955 ; Berger & King, 1980) ce qui se traduit par une augmentation de la  $P_{50}$ . Cette augmentation de  $P_{50}$  signifie que, pour une pression donnée, le sang des patients drépanocytaires est moins saturé en oxygène (Elbaum & Nagel, 1981 ; Lonsdorfer et al. 1990) (Figure 7), traduisant une diminution du pouvoir oxyphorique. Au niveau tissulaire, où la pression en oxygène est faible, une forte  $P_{50}$ , soit une faible affinité, engendre une libération facilitée de l'oxygène au niveau des tissus périphériques (Elbaum & Nagel, 1981 ; Young et al. 2000) mais aussi une augmentation de la proportion d'hémoglobine S désoxygénée et donc potentiellement polymérisable. L'hémoglobine F, à l'inverse, présente une forte affinité pour l'oxygène. Puisque les patients drépanocytaires présentent un taux résiduel de cette hémoglobine allant de 5 à 15%, cette dernière compense en partie les anomalies liées au faible pouvoir oxyphorique. Cela est d'ailleurs un processus de protection efficace pendant les premiers mois de vie du patient durant lesquels l'hémoglobine F est encore abondante (May & Huehns, 1975). La courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine se décale également vers la droite lors d'une élévation de la température corporelle et d'une diminution du pH plasmatique (effet Bohr). Ces phénomènes physiologiques, particulièrement observables au niveau des capillaires sanguins tissulaires, accentuent encore le risque de survenue du processus de polymérisation de l'hémoglobine S. Puisque ce décalage vers la droite de la courbe est dépendant de la concentration en hémoglobine S (Bessis & Delpech, 1982), les sujets porteurs du trait drépanocytaire sont donc plus épargnés par ce mécanisme car ils sont « protégés »



par la présence d'hémoglobine A. Ils possèdent d'ailleurs quasiment la même  $P_{50}$  que les sujets sains (Becklake et al. 1955 ; Lonsdorfer et al. 1990 ; Young et al. 2000).



**Figure 7 : Courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine d'un sujet sain et d'un patient drépanocytaire.**

Extraite de Berger & King (1980).

## **2.2. Conséquences physiopathologiques et présentation clinique du phénotype drépanocytaire**

La polymérisation de l'hémoglobine S est responsable d'une cascade d'événements pathologiques qui, à leur tour, vont entraîner un large éventail de complications. Les crises vaso-occlusives et l'anémie hémolytique chronique représentent les manifestations cliniques majeures de la drépanocytose. Ces dernières entraînent des troubles hémorhéologiques, une moindre biodisponibilité en monoxyde d'azote (NO), une inflammation, un stress oxydatif, une hypercoagulabilité, une adhérence accrue des neutrophiles et une activation des plaquettes (Rees et al. 2010). Ainsi, les conséquences physiopathologiques de la polymérisation de cette hémoglobine S ainsi que le phénotype clinique du patient drépanocytaire sont présentés ci-dessous et schématisés dans la Figure 8 (Rees et al. 2010).

### **2.2.1. L'hémolyse et l'anémie hémolytique chronique**

Le processus de polymérisation de l'hémoglobine S induit des dommages au niveau du cytosquelette et de la membrane des globules rouges, augmentant ainsi leur fragilité (Barabino et al. 2010). Ces globules rouges porteurs de l'hémoglobine S se rompent plus facilement, libérant ainsi dans le plasma l'hémoglobine qu'ils contiennent (hémolyse). Si l'hémolyse est un mécanisme physiologique normal d'apoptose du globule rouge vieillissant, intervenant normalement au bout de 120 jours (Shemin & Rittenberg, 1946 ; Callender et al. 1947), la



durée de vie d'un globule rouge contenant de l'hémoglobine S est réduite à seulement 15 jours (McCurdy & Sherman, 1978).

L'hémolyse des globules rouges peut être intra- (1/3) et/ou extravasculaire (2/3) (Hebbel & Miller, 1984). L'hémolyse intravasculaire est la plus destructrice pour les patients drépanocytaires car elle entraîne le largage de l'hémoglobine dans le plasma. Cette hémoglobine libre va entraîner la neutralisation du NO (Reiter et al. 2002) en générant des radicaux libres, tels que les radicaux hydroxyles et superoxydes (Repka & Hebbel, 1991). Le NO est un radical libre très réactif qui régule le tonus vasodilatateur basal en inhibant l'entrée du calcium dans les cellules musculaires lisses (Gladwin & Schechter, 2001). Ainsi, la libération de l'hémoglobine dans le plasma pendant l'hémolyse entraîne une moindre biodisponibilité du NO contribuant à une vasoconstriction (Reiter et al. 2002 ; Gladwin, 2006). La libération de l'arginase des globules rouges dans le plasma lors de l'hémolyse accentue également cette moindre biodisponibilité du NO (Morris et al. 2005). En effet, l'arginase dégrade la L-arginine, substrat de l'enzyme produisant le NO, la NO synthase endothéliale, et réduit par conséquent la synthèse de NO. On a donc un double mécanisme de déplétion du NO : séquestration du NO par l'hémoglobine libre et déficit de sa production par déplétion de son précurseur. Le déficit chronique en NO et en arginine pourrait donc contribuer à l'état d'hypercoagulabilité dans la drépanocytose (Faès et al. 2018). Des corrélations entre le taux d'hémolyse, les niveaux d'activation plaquettaire et les facteurs procoagulants dans le sang ont en effet été observés (Ataga et al. 2008). L'hémoglobine libre est ensuite éliminée du plasma par le système réticuloendothélial, notamment grâce à l'haptoglobine et l'hémopexine (Belcher et al. 2010). La moindre biodisponibilité du NO, provoquée l'hyperhémolyse chronique, peut entraîner un dysfonctionnement endothélial et des changements prolifératifs dans l'intima et les muscles lisses des vaisseaux sanguins. Ces conséquences vont favoriser le développement de vasculopathies responsables de plusieurs manifestations cliniques (Gladwin & Vichinsky, 2008). Ce dysfonctionnement endothélial représente un élément majeur de la physiopathologie de la drépanocytose.

L'hémolyse extravasculaire est prépondérante et s'effectue par le système réticuloendothélial qui joue un grand rôle dans la phagocytose des globules rouges sénescents. Chez les patients drépanocytaires, une forte phagocytose des hématies par les macrophages a été observée avec en moyenne 19% d'ingestion contre 3% pour les globules rouges de sujets sains (Hebbel & Miller, 1984). Ces auteurs expliquent que ces destructions anormales pourraient être dues à un taux anormalement élevé d'IgG (molécules reconnues par les macrophages) à la surface des globules rouges. Ainsi, stimulée par la nécrose des hématies elles-mêmes, l'hémolyse, qu'elle soit intra- et/ou extravasculaire, est mal compensée par l'hématopoïèse (synthèse de nouveaux globules rouges par la moelle osseuse) (Rees et al. 2010).

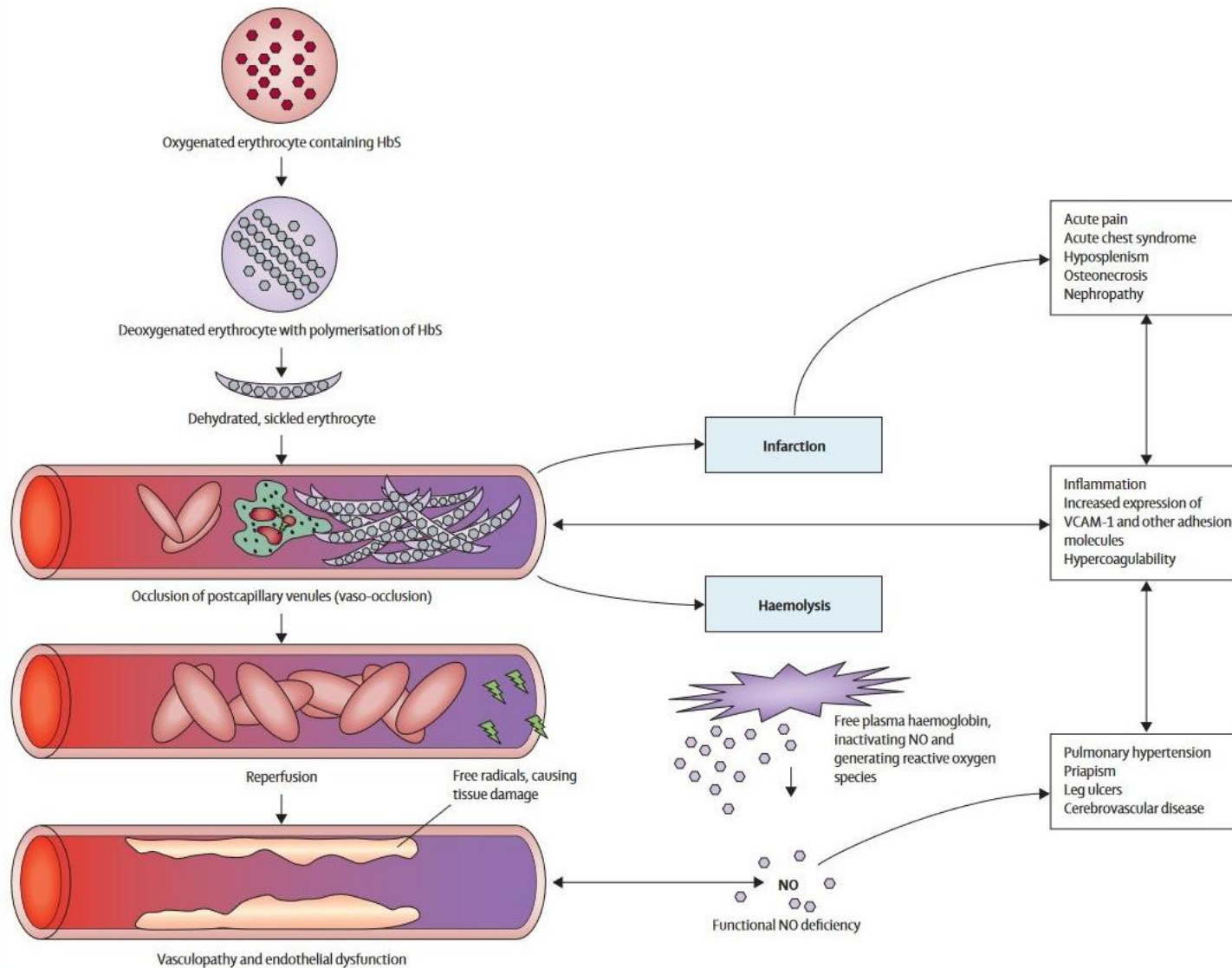
D'un point de vue clinique, le patient drépanocytaire va donc souffrir d'une anémie hémolytique chronique et sévère (Rees et al. 2010) qui se caractérise par un faible taux d'hémoglobine (7 et 9 g/dL ; valeurs normales : 12-16 g/dL), un taux élevé de réticulocytes (cellules précédant le stade d'érythrocyte dans l'érythropoïèse) (2 à 3% ; valeur normale : 0,45 à 1,8%) et un hématoците (volume occupé par les hématies circulant dans le sang exprimé en pourcentage par rapport au volume total du sang) très faible (25-30% ; valeur normale : 37-52%). Un faible taux d'hémoglobine, associé à une hémolyse importante, favorise le développement de vasculopathies qui se compliquent d'une hypertension systémique et pulmonaire (Pegelow et al. 1997 ; Gladwin et al. 2004 ; Kato et al. 2006). Enfin, plusieurs études épidémiologiques mettent également en évidence des complications chroniques associées au faible taux d'hémoglobine et à l'importante hémolyse intravasculaire, telles que : la cholélithiase, l'ulcère des jambes et le priapisme (Gladwin et al. 2004 ; Kato et al. 2007). Comme les patients drépanocytaires présentent également une désaturation artérielle en oxygène (Setty et al. 2003 ; Quinn & Sargent, 2008) et une augmentation de la P<sub>50</sub> (Young et al. 2000), l'association de l'anémie et du faible hématoците peut encore aggraver l'hypoxémie et l'oxygénation des tissus, comme cela est notamment observé au niveau cérébral (Nahavandi et al. 2004).

### 2.2.2. Microcirculation vasculaire et hémoglobine S : les crises vaso-occlusives

Les occlusions vasculaires sont causées par l'enclavement des drépanocytes et des leucocytes (globules blancs) dans la microcirculation entraînant une ischémie tissulaire (Rees et al. 2010). La genèse de ces occlusions est un processus complexe, multifactoriel et pluricellulaire. L'évènement déclencheur de ces crises est souvent inflammatoire. De nombreuses études ont montré que des épisodes d'hypoxies ou inflammatoires augmentent le potentiel d'adhésion endothéliale des leucocytes et des globules rouges, déclenchant ainsi l'occlusion vasculaire (Osarogiagbon et al. 2000 ; Frenette et al. 2002 ; Turhan et al. 2002 ; Belcher et al. 2003). Les caractéristiques morphologiques des drépanocytes (rigidité et perte de déformabilité) contribuent mécaniquement à l'occlusion vasculaire en compliquant leur passage dans la microcirculation. De plus, la moindre biodisponibilité du NO, notamment en raison de l'hémolyse, entraîne un déséquilibre du tonus vasculaire en faveur d'une vasoconstriction (Ergul et al. 2004). Ces différents facteurs favorisent l'occlusion microvasculaire épisodique et l'ischémie et constituent un cercle vicieux où i) les phénomènes d'adhésion ralentissent le flux sanguin et favorisent le processus de falciformation du globule rouge, ii) ces derniers obstruent les microvaisseaux et iii) ces obstructions vasculaires créent une hypoxémie locale et donc un contexte de plus en plus propice à la polymérisation de l'hémoglobine S. Lorsque cette occlusion est suivie d'une restauration du flux sanguin, la

reperfusion provoque une libération additionnelle de radicaux libres particulièrement délétères pour la fonction endothéliale et les tissus (Rees et al. 2010).

D'un point de vue clinique, les occlusions vasculaires sont nommées les crises vaso-occlusives et elles représentent les manifestations cliniques les plus fréquentes, mais aussi les plus sévères pour le patient drépanocytaire (Habibi, 2004). Elles peuvent se dérouler dans tous les territoires vasculaires de l'organisme mais elles sont volontiers plus abondantes au niveau des extrémités des membres (*hand-foot syndrome*) (Ejindu et al. 2007), des hanches et de l'abdomen (Ahmed et al. 2005). Ces crises peuvent causer des complications cliniques aiguës telles que des atteintes ischémiques itératives des tissus, entraînant des douleurs intenses et possiblement une défaillance d'organe. Le syndrome thoracique aigu en est un exemple typique et l'une des principales causes d'hospitalisations et de décès des patients drépanocytaires (Vichinsky et al. 2000). Les complications cliniques chroniques causées par une atteinte progressive des organes due à ces manifestations ischémiques sont : l'hyposplénisme, l'insuffisance rénale, l'ostéonécrose et l'atteinte hépatique (Rees et al. 2010). Si les crises vaso-occlusives entraînent la défaillance d'organes vitaux tels que la rate, le rein, le cerveau et les os (Gladwin & Sachdev, 2012), la littérature concernant l'impact de ces crises sur le tissu musculaire est relativement rare, peut-être en raison de sa nature moins vitale que l'atteinte d'autres organes. Bien que le tissu musculaire soit richement vascularisé et sensible à l'hypoxie, quelques épisodes de myonécrose subséquent aux crises vaso-occlusives ont été décrits chez ces patients (Mani & Duffy, 1993 ; Malekgoudarzi & Feffer, 1999). Si ces complications musculaires sont assez méconnues, elles n'en demeurent probablement pas moins fréquentes.



### **Figure 8 : Pathophysiologie de la drépanocytose et conséquences cliniques associées.**

Les effets de la polymérisation de l'hémoglobine S, de l'hyperviscosité, de l'occlusion vasculaire, de l'hémolyse et du dysfonctionnement endothélial sont représentés. La désoxygénation provoque la polymérisation de l'hémoglobine S, entraînant la falciformation du globule rouge en forme de faucille (drépanocytes). L'occlusion vasculaire est la conséquence de l'interaction des drépanocytes, des leucocytes et de l'endothélium vasculaire. Ces occlusions peuvent conduire à l'hémolyse, à l'inflammation et l'infarctus tissulaire. L'inflammation favorise l'expression des molécules d'adhésion endothéliales accentuant la tendance des drépanocytes à adhérer à l'endothélium et par conséquent, accroît le risque d'occlusion vasculaire. La reperfusion du tissu ischémique génère des radicaux libres et des dommages oxydatifs. Les hématies endommagées libèrent de l'hémoglobine libre dans le plasma, qui se lie fortement au NO, causant une déficience fonctionnelle en NO et contribuant au développement d'une vasculopathie. VCAM = molécule d'adhésion cellulaire vasculaire. Extraite de Rees et al. (2010).

## **3. Exercice physique et drépanocytose**

### **3.1. Facteurs de risques associés à l'exercice intense et/ou prolongé**

Chez le sujet sain, l'exercice physique aigu et intense est connu pour induire une augmentation de la libération de l'oxygène par les globules rouges, des altérations hémorhéologiques, une augmentation de l'inflammation vasculaire, une activation endothéliale, un stress oxydatif, une accumulation de lactate et une acidose métabolique (Osnes & Hermansen, 1972 ; Lindinger et al. 2005 ; Connes et al. 2013). Si ces altérations physiologiques sont bien tolérées chez le sujet sain, chez le patient drépanocytaire ce type d'effort est susceptible d'induire la polymérisation de l'hémoglobine S. En effet, puisque l'hémoglobine S a tendance à polymériser dans sa forme désoxygénée, toute situation hypoxémique et hypoxique peut favoriser la falciformation des globules rouges (Habibi et al. 2004 ; Rees et al. 2010). De plus, la déshydratation favoriserait l'apparition de drépanocytes car l'eau est nécessaire à la réoxygénation du globule rouge (Clark et al. 1980). Aussi, puisque le *delay time* est fortement dépendant de la température, une augmentation, même minime, de la température corporelle favorise la polymérisation de l'hémoglobine S (Hofrichter et al. 1974). Un facteur de risque également important est l'acidose métabolique survenant lors de l'effort (Chatel et al. 2018). En effet, plusieurs études réalisées *in vitro* ont montré qu'une diminution du pH entraîne une augmentation de la proportion de globules rouges falciformes (Lange et al. 1951 ; Greenberg et al. 1957 ; Greenberg & Kass, 1958) et que cette diminution est concomitante avec la polymérisation de l'hémoglobine S (Briehl & Ewert, 1973 ; Bookchin et al. 1976 ; Magdoff-Fairchild et al. 1976 ; Ueda & Bookchin, 1984). Même lors d'un effort de faible intensité le pH diminue, par conséquent, la surveillance du pH sanguin pendant l'exercice est une préoccupation majeure. Si l'évaluation du pH lors de l'exercice est complexe, il peut cependant être contrôlé, bien qu'indirectement, en mesurant la concentration de lactate dans le sang (Chatel et al. 2018). Le lactate est, en effet, étroitement corrélé avec le pH (Osnes & Hermansen, 1972).

Tous ces facteurs de risques augmentent la proportion de globules rouges falciformes et donc potentiellement la survenue de crises vaso-occlusives (Connes et al. 2011). De ce fait, les cliniciens et les parents des patients drépanocytaires sont réticents à leur autoriser la pratique d'une activité physique. Le patient drépanocytaire est donc classiquement confiné à l'écart de tout exercice physique de peur que l'effort favorise la survenue de crises vaso-occlusives (Connes et al. 2011 ; Martin et al. 2018). Les patients drépanocytaires vont donc, par principe de précaution, adopter un profil d'ultra-sédentaire.

### **3.2. Aptitude physique et réponses à l'exercice**

Plusieurs études rapportent une diminution des performances physiques chez les patients drépanocytaires comparés à des sujets sains (Millis et al 1994 ; Moheeb et al. 2007 ; Balayssac-Siransy et al. 2011). L'évaluation à l'exercice des patients drépanocytaires, par un test incrémental sur ergocycle où la puissance est augmentée toutes les 2 minutes, montre d'importantes limitations de leurs capacités respiratoires et cardiocirculatoires maximales (Callahan et al. 2002). Si aucune complication sévère n'a été rapportée lors de ce test, tous les patients présentaient des valeurs pics de consommation d'oxygène ( $VO_{2pic}$ ) (Pianosi et al. 1991 ; Anthi et al. 2007), de fréquence cardiaque et de débit cardiaque plus faibles que des sédentaires sains (Callahan et al. 2002). Cela s'explique également par le fait qu'ils présentent des anomalies d'adaptations respiratoires, cardiovasculaires et métaboliques en réponse à un niveau d'exercice donné : une dyspnée du moindre effort est observée, l'équivalent respiratoire du dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) est plus élevé (malgré l'hyperventilation), le ventricule gauche présente un trouble de la relaxation, la pression artérielle systolique est anormalement élevée, une hypoxémie artérielle est observée et le seuil ventilatoire est plus faible (mise en jeu plus précoce du métabolisme anaérobie lactique pour une charge de travail donnée, Waltz et al. 2012a). Si certaines altérations lors de l'exercice peuvent être attribuées aux anomalies pulmonaires et cardiovasculaires (incluant les anomalies hémorhéologiques), d'autres semblent liées à des altérations fonctionnelles musculaires comme en témoigne la restriction de la force musculaire maximale de ces patients (Dougherty et al. 2011 ; Waltz et al. 2012b ; Chatel et al. 2017a ; Dougherty et al. 2018). Ainsi, la faible aptitude physique et l'intolérance à l'effort des patients drépanocytaires constituent d'importantes limitations lors des activités, même simples, de la vie quotidienne.

### **3.3. Toutes les activités physiques doivent-elles, pour autant, être exclues ?**

Alors que l'exercice d'intensité élevée peut augmenter le risque de falciformation des globules rouges (Bartolucci et al. 2016), l'exercice d'intensité modérée a cependant démontré

son innocuité (Martin et al. 2018). Quelques études ont en effet rapporté la faisabilité et l'innocuité d'un exercice aiguë (Balayssac-Siransy et al. 2011 ; Faës et al. 2014 ; Hedreville et al. 2014) et chronique (Liem et al. 2017) d'intensité modérée chez des patients drépanocytaires. Dans ces études, les patients ont effectué des exercices incrémentaux sous-maximaux (arrêtés avant l'épuisement volontaire ou l'apparition des symptômes) ou des exercices d'endurance d'intensité modérée allant jusqu'à 30 minutes sans complications cliniques graves (Balayssac-Siransy et al. 2011 ; Faës et al. 2014 ; Hedreville et al. 2014 ; Liem et al. 2017).

Dans ce contexte, la pratique d'une activité physique semble possible chez les patients drépanocytaires à condition d'être adaptée (intensité modérée) et individualisée à l'aptitude physique de chaque patient. Elle doit aussi être réalisée, de préférence, sous la supervision de professionnels de la santé.

## **4. Les traitements de la drépanocytose**

### **4.1. Prise en charge des complications aiguës**

Cette sous-partie apporte quelques notions essentielles à la prise en charge des 2 principales complications aiguës de la pathologie, que sont les crises vaso-occlusives et le syndrome thoracique aigu.

#### **4.1.1. Crises vaso-occlusives**

Les crises vaso-occlusives sont les premières causes d'hospitalisation des patients drépanocytaires. Le plus souvent, elles se manifestent par l'apparition soudaine de douleurs articulaires ou osseuses très intenses. A l'hôpital, le traitement symptomatique de la douleur consiste en une titration initiale. Afin de diminuer le besoin d'opioïdes, Bartolucci et al. (2009) ont proposé l'administration d'un anti-inflammatoire non-stéroïdien, le ketoprofen, mais celui-ci n'était pas efficace dans le traitement des crises. Les corticostéroïdes peuvent également raccourcir les épisodes de douleur aiguë. Cependant, l'utilisation de ces médicaments a nettement diminué en raison d'une fréquence élevée de douleur de rebond, justifiant même une réadmission à l'hôpital (Griffin et al. 1994). Des études sur le poloxamère 188 (Orringer et al. 2001) et sur le NO inhalé (Weiner et al. 2003) ont également rapporté quelques avantages à la marge. Malgré l'importance de la douleur, il n'existe actuellement aucun traitement spécifique pouvant modifier l'histoire naturelle d'un épisode aigu, et on peut déplorer le faible nombre de sujets de recherches en cours dans ce domaine (Rees et al. 2010).

#### 4.1.2. Syndrome thoracique aigu

Le syndrome thoracique aigu, pathologie pulmonaire aiguë, représente la deuxième cause d'hospitalisation des patients drépanocytaires ainsi qu'une cause importante de décès. Ce syndrome se caractérise par le développement d'un infiltrat pulmonaire alvéolaire impliquant au moins un segment pulmonaire (Gladwin & Vichinsky, 2008). Les causes sont multifactorielles et peuvent inclure une infection pulmonaire, une embolie graisseuse, une crise vaso-occlusive dans le système vasculaire pulmonaire etc. La gravité varie, mais 13 % des patients ont besoin d'une ventilation mécanique et 3 % en meurent (Vichinsky et al. 2000). Le traitement fait appel à des antibiothérapies à large spectre, à des bronchodilatateurs et au recours à une oxygénothérapie. Si les concentrations d'hémoglobine diminuent considérablement et/ou si l'état clinique du patient se détériore, une transfusion sanguine est couramment administrée. La dexaméthasone peut améliorer l'état clinique et réduire le besoin de transfusion sanguine chez les enfants atteints du syndrome thoracique aigu, bien que son utilisation soit limitée par l'apparition d'une douleur de rebond lors de l'arrêt de la transfusion (Vichinsky et al. 2000).

### **4.2. Les traitements de fond**

#### 4.2.1. Programme transfusionnel ou échange transfusionnel

Les transfusions sanguines sont fréquemment utilisées afin de corriger l'anémie aiguë mais aussi de diminuer le pourcentage d'hémoglobine S. Cela supprime, un temps, la synthèse de cette hémoglobine et réduit l'hémolyse. Elles sont généralement utilisées à la suite d'un épisode d'anémie hémolytique sévère, de séquestration hépatique et/ou splénique et parfois lors d'un syndrome thoracique aigu ou d'un accident vasculaire cérébral (Steinberg, 1999 ; Ellsion & Shaw, 2007). Le recours à un échange transfusionnel est nécessaire si la concentration initiale d'hémoglobine est élevée, ou s'il est nécessaire de diminuer rapidement le pourcentage d'hémoglobine S sans augmenter l'hématocrite et la viscosité du sang. L'échange transfusionnel est généralement utilisé chez des patients présentant des symptômes neurologiques aigus. Cependant, l'utilisation de cette technique peut entraîner des allo-immunisations et une surcharge en fer dans les organes vitaux des patients, la rendant ainsi responsable d'une importante morbidité. C'est pourquoi, cette surcharge en fer implique l'utilisation conjointe d'un chélateur de fer afin d'en diminuer les fortes concentrations délétères pour l'organisme (Steinberg, 2010 ; Capellini et al. 2011).



#### 4.2.2. Hydroxycarbamide

En 1995 est apparu le premier médicament capable de réduire significativement la morbidité et la mortalité des patients drépanocytaires, chez l'enfant comme chez l'adulte : l'hydroxyurée (Steinberg et al. 2003). L'hydréa® est une molécule qui interfère sur le cycle cellulaire et sur la multiplication des cellules, en agissant sur la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN). En augmentant la concentration d'hémoglobine F dans le sang, ce médicament réduit significativement la fréquence des crises vaso-occlusives, les syndromes thoraciques aigus, les besoins de transfusion sanguine et d'admission à l'hôpital des patients drépanocytaires (Charache et al. 1995). L'hydroxyurée permet également d'augmenter l'espérance de vie (Steinberg et al. 2003 ; Voskaridou et al. 2010), de protéger contre les maladies cérébro-vasculaires (Zimmerman et al. 2007), de réduire l'hypoxémie (Singh et al. 2008) et la protéinurie (Fitzhugh et al. 2005). Cependant, en raison des craintes concernant les effets toxiques de ce médicament, son utilisation est généralement limitée aux patients ayant une évolution clinique sévère (Brawley et al. 2008). En effet, bien qu'elle soit d'un faible niveau de preuves, l'étude de Lankron et al. (2008) laisse supposer que l'hydroxyurée prédispose aux maladies malignes. Des études chez la souris et plusieurs cas cliniques rapportés soulignent que l'hydroxyurée semble susceptible de causer une infertilité masculine (Berthaut et al. 2008). Si environ 10 à 30% des patients en Europe et aux Etats-Unis prennent ce traitement (Rees et al. 2010), Brawley et ses collaborateurs (2008) estiment qu'il reste encore largement sous-utilisé.

#### 4.2.3. GBT440 ou voxelotor, un traitement prometteur

GBT440 (nom générique voxelotor), premier médicament de sa catégorie, est une petite molécule qui module l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Lorsque cette molécule est liée à l'hémoglobine S, elle représente un puissant inhibiteur *in vivo* et *in vitro* de la polymérisation de l'hémoglobine S (Oksenberg et al. 2016 ; Telfer et al. 2016 ; Metcalf et al. 2017 ; Dufu & Oksenberg, 2018). La phase 3 de l'essai clinique HOPE (*Hemoglobin Oxygen Affinity Modulation to Inhibit HbS PolymErization*) est actuellement en cours. Les chercheurs ont observé que le traitement par GBT440 a été bien toléré chez 13 adolescents drépanocytaires. Les données cliniques préliminaires de 4 adolescents à 12 semaines montrent une augmentation du taux d'hémoglobine et une réduction de l'hémolyse, améliorant ainsi l'apport d'oxygène dans les tissus périphériques. Une récente étude de cas rapporte également l'impact positif de ce traitement sur la réduction du taux de bilirubine et sur la jaunisse d'un patient drépanocytaire (Telfer et al. 2018). Si les données préliminaires pour voxelotor sont prometteuses, de nombreuses recherches dans ce domaine restent encore à réaliser.

#### 4.2.4. Greffe de cellules souches hématopoïétiques

L'allogreffe (transfert d'un donneur à un patient) de cellules souches hématopoïétiques, cellules à l'origine de la production de toutes les lignées de cellules sanguines, a été utilisée pour la première fois chez un patient drépanocytaire de 25 ans et constitue actuellement le seul traitement curatif de la drépanocytose (Johnson et al. 1984). Cependant, seulement quelques centaines de patients dans le monde ont reçu une greffe et cette procédure est, pour l'essentiel, applicable aux enfants ayant des frères et sœurs HLA (*human leukocyte antigen*) compatibles. En pratique, seulement 18% des patients ont un donneur compatible (Mentzer et al. 1994 ; Krishnamurti et al. 2003). Cette procédure est généralement réservée aux patients ayant des formes sévères de drépanocytose. Le plus souvent ce sont des enfants atteints d'une maladie cérébro-vasculaire dont la survie dépend des transfusions. A la suite de cette procédure, les études indiquent une survie globale de 92 à 94 %, une survie sans incident de 82 à 86 % et une mortalité de 7 % (Bhatia & Walters, 2008).

A l'heure actuelle, la recherche concernant la thérapie génique à partir d'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques connaît des avancées exceptionnelles dans le traitement de la drépanocytose. Si cette thérapie a tout d'abord montré son efficacité dans un modèle de souris drépanocytaires (Pawliuk et al. 2001), elle l'a désormais démontré avec la rémission d'un patient drépanocytaire (Ribeil et al. 2017). Le vecteur de la thérapie génique utilisé chez l'adolescent en question est un lentivirus (LentiGlobin BB305) dans lequel a été introduit le gène codant pour la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine et modifié par une mutation ponctuelle lui conférant ainsi une activité anti-falciforme. Ce patient est, à ce jour, en rémission clinique complète. Son taux d'hémoglobine est normal et la protéine thérapeutique provenant du vecteur s'exprime à un niveau élevé (environ 50 % de l'hémoglobine circulante). De plus, il présente une inhibition totale des phénomènes pathologiques drépanocytaires.

Si la drépanocytose est au coeur d'une recherche thérapeutique moderne, il reste à confirmer que la thérapie génique représente une stratégie efficace à long terme, permettant de prévenir les complications chroniques de la pathologie.

# CHAPITRE 2

## LE MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE

*Ce chapitre présente le tissu étudié dans ce travail doctoral :  
le tissu musculaire strié squelettique.*

*Par son organisation structurée, sa vascularisation et son métabolisme, ce chapitre vise à  
faire un état des lieux des connaissances de ce tissu.*

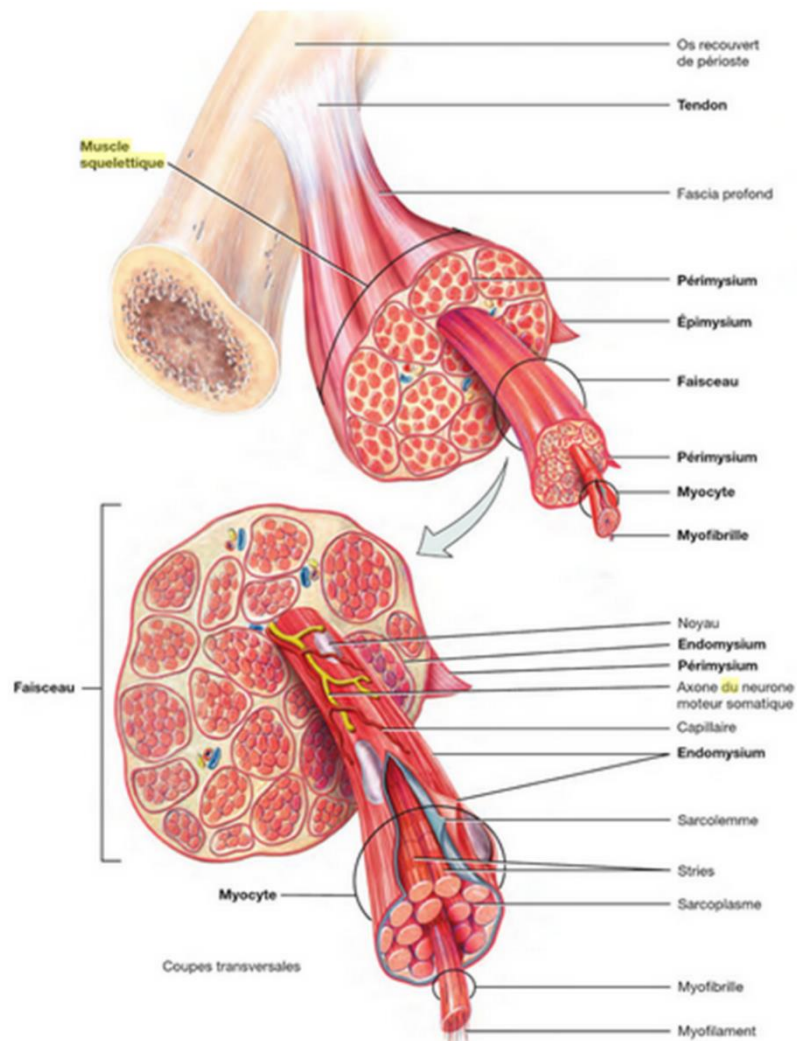
*Tissu hautement plastique avec des capacités de régénération remarquable, il constitue  
un modèle de choix dans l'observation des adaptations structurales, énergétiques et  
microvasculaires à l'exercice.*

# 1. Organisation structurale et propriétés fonctionnelles

Les muscles striés squelettiques représentent un système qui permet à l'être vivant d'agir sur son environnement par la contraction volontaire des muscles.

## 1.1. Structure du muscle et de la fibre musculaire

Le muscle strié squelettique est un tissu unique composé de faisceaux de fibres musculaires. Il est constitué d'enveloppes conjonctives à différents niveaux d'organisation : l'épimysium est l'enveloppe conjonctive la plus externe, puis le périmysium délimite les faisceaux musculaires, et enfin l'endomysium entoure chaque fibre musculaire. Ces enveloppes s'étendent à leurs extrémités et s'unissent pour former le tendon qui relie la structure osseuse à la structure musculaire (Figure 9).

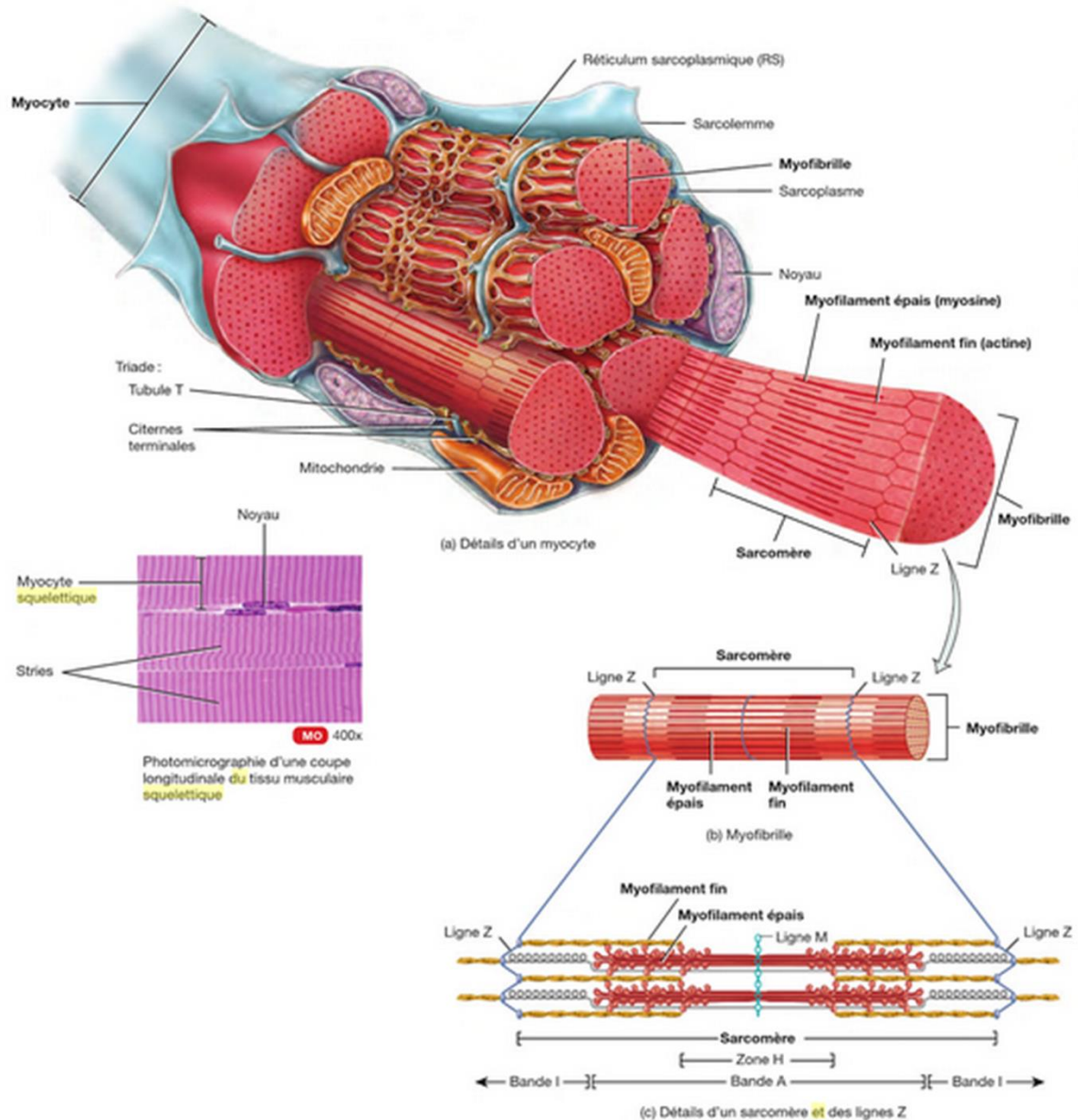


**Figure 9 : Organisation hiérarchique du muscle squelettique.**  
Extraite de Tortora & Dericksson (2017).

Les fibres musculaires représentent un ensemble de cellules cylindriques allongées, juxtaposées les unes à côté des autres, entourées d'une membrane plasmique, le plasmalemme. Elles parcourent en parallèle toute la longueur du muscle entre chaque insertion tendineuse (Lieber & Friden, 2001). Les fibres musculaires sont nées de la fusion entre plusieurs cellules immatures mononucléées, les myoblastes, au cours du développement embryonnaire. Les fibres musculaires matures sont donc plurinucléées et le nombre de noyaux par millimètre de longueur de fibre est estimé à environ 200 (Jones et al. 2005). Ces noyaux, nommés myonucléi, sont retrouvés à la périphérie de la fibre mature sous sa membrane plasmique. Chaque noyau contrôle l'expression protéique de la portion de cellule située immédiatement à sa proximité, c'est le domaine myonucléaire. D'autres noyaux sont présents entre la membrane plasmique et la lame basale de la fibre musculaire, ce sont les noyaux des cellules satellites. La description et l'étude plus spécifique des cellules satellites sera développée à la fin de ce chapitre.

Les fibres musculaires sont formées d'une structure contractile (les myofibrilles) qui initie le mouvement, et d'une composante non contractile (mitochondries, réticulum endoplasmique, sarcolemme, enzymes et substrats métaboliques) qui soutient l'activité contractile. Chaque fibre musculaire contient quelques centaines voire quelques milliers de myofibrilles. Ces myofibrilles sont constituées de filaments protéiques disposés en série donnant cet aspect strié : les sarcomères. Le sarcomère est l'unité fondamentale de la myofibrille dont la structure, vue en coupe longitudinale en microscopie électronique, s'étend d'un disque Z à l'autre. Le disque Z est une structure d'ancrage dense, au centre de chaque bande I. Les sarcomères renferment 2 types de filaments protéiques, qui par leurs alignements, permettent la contraction musculaire : les filaments fins constitués essentiellement d'actine et les filaments épais majoritairement de myosine. Les filaments de myosine sont disposés au centre du sarcomère sur toute la longueur de la bande A alors que les filaments d'actine sont positionnés en périphérie du sarcomère. La contraction musculaire résulte du glissement des filaments fins d'actine sur les filaments épais de myosine par les ponts qui s'établissent entre ces 2 types de myofilaments (Figure 10).

Chaque myofibrille possède également des prolongements membranaires qui s'invaginent à l'intérieur de la cellule musculaire à intervalles réguliers : les tubules transverses (Figure 10). Ils ont pour fonction de propager et d'assurer la diffusion rapide du signal électrique, depuis la périphérie de la fibre jusqu'aux confins de celle-ci. Ce système tubulaire va déclencher la sortie du calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique permettant de créer une excitation rapide et simultanée de toutes les parties de la fibre en réponse au potentiel d'action.



**Figure 10 : Structure d'une fibre musculaire.**  
 Extraite de Tortora & Dericksson (2015).

## 1.2. Les différentes étapes de la contraction musculaire

La contraction musculaire est le résultat de plusieurs étapes entre l'excitation du sarcolemme et la contraction des myofibrilles au sein de la fibre musculaire, c'est le couplage excitation-contraction (Sandow, 1965). Cette excitation provient des unités motrices qui représentent l'unité de base fonctionnelle associant le système nerveux au muscle. L'unité motrice, mise en évidence par les travaux de Liddell et Sherrington en 1925 (Duchateau & Enoka, 1925), se compose d'un motoneurone et des fibres musculaires innervées par ce celui-ci. Ainsi, la contraction musculaire débute par l'arrivée du potentiel d'action au niveau de la

jonction neuromusculaire, entraînant la libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique, l'acétylcholine. En se fixant sur des récepteurs spécifiques post-synaptiques, l'acétylcholine est responsable de la création d'un potentiel d'action qui se propage le long de la membrane plasmique et à l'intérieur de la cellule musculaire via les tubules transverses. Cette onde de dépolarisation active les récepteurs aux dihydropyridines qui vont eux-mêmes activer les récepteurs à la ryanodine. Ces derniers libèrent le calcium contenu dans les citernes du réticulum sarcoplasmique dans le cytosol de la cellule musculaire afin d'initier la contraction. Si la quantité de calcium est suffisante, la traduction du signal électrique en phénomène mécanique est possible. Le calcium, en se fixant sur la troponine-C des filaments fins d'actine, entraîne un changement de conformation de la tropomyosine qui libère le site de liaison de la myosine à la molécule d'actine (Sandow, 1965). La fixation de la tête de myosine sur le filament d'actine nécessite de l'énergie qui est fournie par l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP). Cette hydrolyse entraîne le basculement de la tête de myosine permettant ainsi le glissement du filament fin d'actine le long du filament épais de myosine. Une nouvelle molécule d'ATP est ensuite nécessaire à la libération des sites de liaisons. Lorsque le potentiel d'action prend fin, le muscle se relâche et le calcium restant est recapté par le réticulum sarcoplasmique. Ce cycle de contraction se poursuit tant que de l'ATP est disponible et que la concentration cytoplasmique en calcium est suffisante. La réponse mécanique du muscle suite à la dépolarisation de la membrane plasmique, elle-même consécutive à une stimulation nerveuse, est définie comme une secousse musculaire (Hodgson et al. 2005).

### **1.3. Typologie des fibres musculaires**

Les unités motrices diffèrent en fonction du type de myocytes innervés, du nombre de ces myocytes et enfin des caractéristiques propres du motoneurone qui innerve. Ainsi, en fonction de la typologie de l'unité motrice (lente, intermédiaire ou rapide), ce ne sont pas les mêmes chaînes lourdes de myosine (*myosin heavy chain*, MHC) qui sont exprimées dans les myocytes. En effet, chez l'homme, on distingue les fibres musculaires lentes (I) qui possèdent la forme lente de la myosine (MHCI) et les fibres musculaires rapides (II) qui possèdent la forme rapide de la myosine (MHCII). Les fibres de type IIA (MHCIIA) sont également des fibres dites et classées comme rapides (II) mais qui possèdent des caractéristiques intermédiaires entre les 2 types précédents. On retrouve également 2 autres types de fibres musculaires qui possèdent 2 formes de myosine, elles sont donc dites hybrides : on distingue les MHCI-IIA et les MHCIIA-IIX. Ainsi, les 3 principaux types de fibres musculaires (I, IIA et IIX) diffèrent par leurs caractéristiques morphologiques mais aussi métaboliques qui leur confèrent des propriétés contractiles notablement différentes (Egan & Zierath. 2013). Par exemple, les MHCI produisent une contraction lente et prolongée mais en développant une

force modeste, elles sont très résistantes à la fatigue. Leur capacité d'endurance élevée est due à une production d'énergie durable qui repose essentiellement sur le système oxydatif mais aussi sur une microvascularisation importante. A l'inverse, les MHCIX produisent une contraction rapide avec une production de force élevée mais elles sont cependant très fatigables. Elles produisent essentiellement de l'énergie par les voies glycolytiques. Les caractéristiques contractiles, métaboliques et morphologiques des différents types de fibres sont synthétisées dans le Tableau 2.

Le métabolisme et la structure des fibres musculaires peuvent être modifiés en réponse à divers stimuli (exercice, dénervation, inactivité) (Ross & Leveritt, 2001 ; Patterson et al. 2006 ; Degens et al. 2008 ; Sillen et al. 2013) entraînant alors des changements phénotypiques des fibres. De plus, la proportion des différents types de fibres semble être en partie déterminée génétiquement. Par exemple, des sujets sédentaires de type caucasien ne présentent pas la même répartition de typologie de fibres que des sujets africains au niveau du muscle *vastus lateralis*. Les caucasiens présentent davantage de MHCI et moins de MHCII que des personnes d'origine d'Afrique subtropicale et équatoriale (Ama et al. 1986). Cette proportion de types de fibres est également susceptible d'être modifiée suite à un entraînement de très longue durée. Par exemple, un sprinter de haut niveau possède au niveau du quadriceps environ 24% de MHCI alors qu'un coureur de fond de haut niveau en possède environ 79% (Wilmore et al. 2008).



**Tableau 2 : Caractéristiques contractiles, métaboliques et morphologiques moyennes des différents types de fibres du muscle strié squelettique chez l'Homme.**

	Type II		
	Type I	Type IIA	Type IIX
<b>Caractéristiques générales</b>			
<i>Isoformes des chaînes de myosines</i>	MHCI	MCHIIA	MHCIIX
<i>Caractéristiques contractiles et métaboliques</i>	Contraction lente, très oxydative, résistante à la fatigue	Contraction rapide, oxydative-glycolytique, résistante à la fatigue	Contraction rapide, glycolytique, très fatigable
<i>Production de force</i>	Faible	Intermédiaire	Elevée
<i>Capacité d'endurance</i>	Elevée	Intermédiaire	Faible
<i>Seuil de recrutement</i>	Toutes les intensités	>40%VO <sub>2max</sub>	>75%VO <sub>2max</sub>
<b>Caractéristiques morphologiques</b>			
<i>Nombre de capillaires par fibre</i>	4,2	4,0	3,2
<i>Densité mitochondriale</i>	Elevée	Intermédiaire	Faible
<i>Surface des fibres, μm<sup>2</sup></i>	5310	6110	5600
<i>Pourcentage de distribution des fibres</i>	54	32	13
<i>Domaine myonucléaire</i>	Petit	Intermédiaire	Grand
<b>Activités enzymatiques glycolytiques et oxydatives<sup>a</sup></b>			
<i>Créatine kinase</i>	13,1	16,6	
<i>Phosphofruktokinase</i>	7,5	13,7	17,5
<i>Glycogène phosphorylase</i>	2,8	5,8	8,8
<i>Lactate déshydrogénase</i>	94	179	211
<i>Citrate synthase</i>	10,8	8,6	6,5
<i>Succinate déshydrogénase</i>	7,1	4,8	2,5
<i>β-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase</i>	14,8	11,6	7,1
<b>Caractéristiques métaboliques</b>			
<i>Potentiel oxydatif</i>	Elevé	Intermédiaire -Elevé	Faible
<i>Potentiel glycolytique</i>	Faible	Intermédiaire -Elevé	Elevé
<i>Type d'exercice</i>	Exercice prolongé d'intensité faible	Durée moyenne, intensité élevée	Durée courte, effort maximal

Données provenant du muscle *vastus lateralis* d'hommes sédentaires. <sup>a</sup>mmol kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> excepté pour la créatine kinase en mmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>. Extrait et modifié de Egan & Zierath (2013).

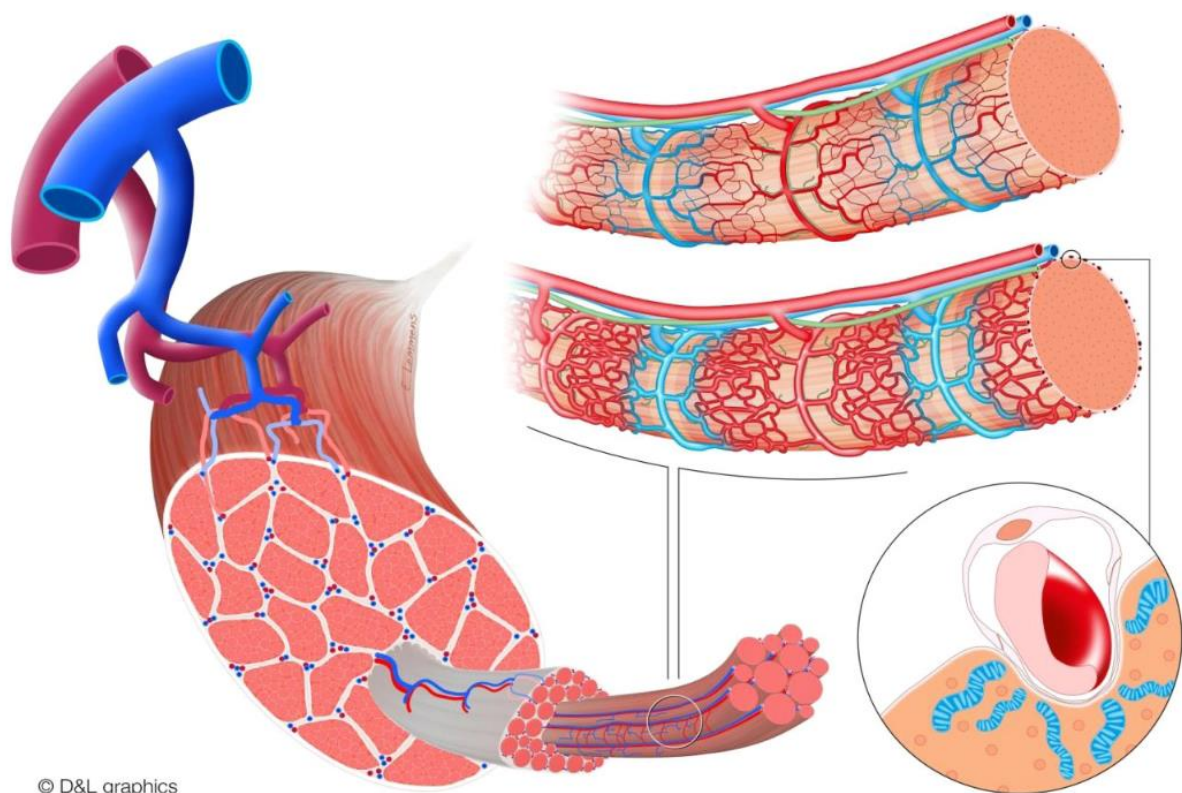
## 2. Réseau vasculaire et microvasculaire

Le système vasculaire comprend plusieurs types de vaisseaux : les artères, les artérioles, les capillaires, les veines et les veinules (Figure 11). Ce système a pour fonction essentielle d'assurer un apport en oxygène et en nutriments adéquat à la demande métabolique cellulaire. Il sert également à l'évacuation des produits du métabolisme musculaire (voire à leur distribution dans l'organisme). En outre, la répartition du débit sanguin est notamment possible grâce à des mécanismes de régulations qui permettent de modifier le diamètre des vaisseaux. Les artères et les artérioles transportent le sang riche en oxygène et en nutriments du cœur vers les tissus musculaires jusqu'aux capillaires où ont lieu les échanges. Le sang appauvri en oxygène et chargé en molécules/ions issus de la contraction musculaire [lactate, proton (H<sup>+</sup>), phosphate inorganique (Pi)...] est ensuite reconduit par les veinules puis les veines jusqu'au cœur. Ce système vasculaire forme donc un circuit fermé. Chaque muscle strié squelettique est alimenté par une ou plusieurs artères nourricières qui se ramifient en petites artères puis en artérioles. Dans le muscle, ces ramifications s'intensifient

et conduisent à la formation d'un réseau capillaire dense comprenant de nombreuses anastomoses (connexions entre 2 vaisseaux sanguins). S'il n'existe pas de véritable séparation anatomique entre la macro-circulation et la microcirculation, le système vasculaire d'approvisionnement peut tout de même être distingué selon 3 étages en fonction du diamètre des vaisseaux :

- Le système macrovasculaire constitué d'artères ayant un diamètre supérieur à 1 mm.
- Le réseau des artérioles dont le diamètre est d'environ 30  $\mu\text{m}$  et qui participent aux mécanismes de résistance systémique.
- La microcirculation constituée de capillaires dont le diamètre est d'environ 8  $\mu\text{m}$ .

Les caractéristiques morphologiques des vaisseaux diffèrent aussi en fonction de l'épaisseur de la paroi et le diamètre interne de leur lumière. Ces réseaux macro- et microvasculaires sont des structures hautement plastiques qui peuvent s'adapter aux diverses contraintes environnementales afin de maintenir une perfusion adéquate en oxygène.



**Figure 11 : Représentation schématique de l'architecture vasculaire du muscle.**

A gauche : les artères se ramifient en artérioles puis en artérioles terminales ; celles-ci sont orientées perpendiculairement aux fibres musculaires. En haut à droite : 2 fibres musculaires sont représentées avec leurs réseaux microvasculaires. Les artérioles terminales (rouge) se ramifient en de nombreux capillaires (rouge à bleu). Des vaisseaux lymphatiques sont également représentés (vert) montant le long des artérioles et des veinules (bleu). Lorsque le muscle est au repos (fibre supérieure), la microvascularisation est intermittente et la perfusion n'est pas homogène. La contraction musculaire (fibre inférieure) entraîne une vasodilatation des artérioles terminales améliorant la perfusion. En bas à droite : un capillaire est représenté enchâssé dans le sarcolemme augmentant ainsi le contact entre les

myocytes et les cellules endothéliales. Les mitochondries des myocytes se regroupent le long du capillaire, réduisant ainsi la distance nécessaire à la diffusion de l'oxygène et des nutriments. Extraite de Kusters & Barrett (2016).

## **2.1. Artères et artérioles**

Les artères représentent les vaisseaux sanguins les plus larges avec une lumière d'un diamètre pouvant aller de 1 à 4 mm, lui permettant d'accueillir un grand volume de sang. Leur rôle est de transporter le sang riche en oxygène et en nutriments depuis le cœur jusqu'aux artérioles des tissus. Avec une lumière d'un diamètre moyen de 30  $\mu\text{m}$ , les artérioles sont essentielles pour ralentir ou résister à l'écoulement sanguin, phénomène nommé : résistance vasculaire systémique (Christensen & Mulvany, 2001). La paroi artérielle est dotée de propriétés élastiques et contractiles. Ces parois sont épaisses et résistantes à la haute pression du sang éjecté depuis le cœur. La paroi artérielle est composée de 3 couches : la tunique la plus externe, l'adventice ; la couche médiane, la média, et la tunique la plus interne, l'intima. Cette compartimentation est commune à tous les vaisseaux mais l'importance relative de chacun de ces éléments diffère en fonction des secteurs vasculaires (Figure 12).

### **2.1.1. Composition des parois des artères et des artérioles**

L'adventice représente la couche la plus externe de la paroi artérielle. Composée de tissu conjonctif et de fibres élastiques, elle protège l'artère contre une contrainte mécanique importante. La media est la couche moyenne de la paroi artérielle et aussi la plus épaisse. Elle est constituée de cellules musculaires lisses (30% du volume total de la média) et d'éléments extracellulaires tels que des fibres élastiques et du collagène. On distingue 2 types d'artères : les artères élastiques (aorte et ses branches) et les artères musculaires (vaisseaux de distribution dits de résistance : petites artères et artérioles). Le nombre de cellules musculaires lisses est plus important dans les petites artères. Les cellules musculaires lisses sont empilées de façon concentrique en couches appelées feuillets musculo-élastiques (Clark & Galgov, 1985). Le nombre de feuillets musculo-élastiques est proportionnel au diamètre du vaisseau. L'intima est la couche interne de la paroi artérielle. Elle est composée de l'endothélium reposant sur une membrane basale et d'une couche sous-endothéliale de soutien qui est séparée de la media par une limitante élastique interne. L'endothélium est une barrière de diffusion engagée dans le catabolisme ou le métabolisme de substances circulantes dans le sang (Aird, 2004). Les artères musculaires possèdent une lamelle élastique interne qui sépare la média de l'intima, et une lamelle externe qui sépare la média de l'adventice. Les artérioles sont également composées des 3 couches (adventice, media, intima) mais leur média est, à l'inverse des artères, dotée en grande majorité de cellules musculaires lisses et de rares fibres

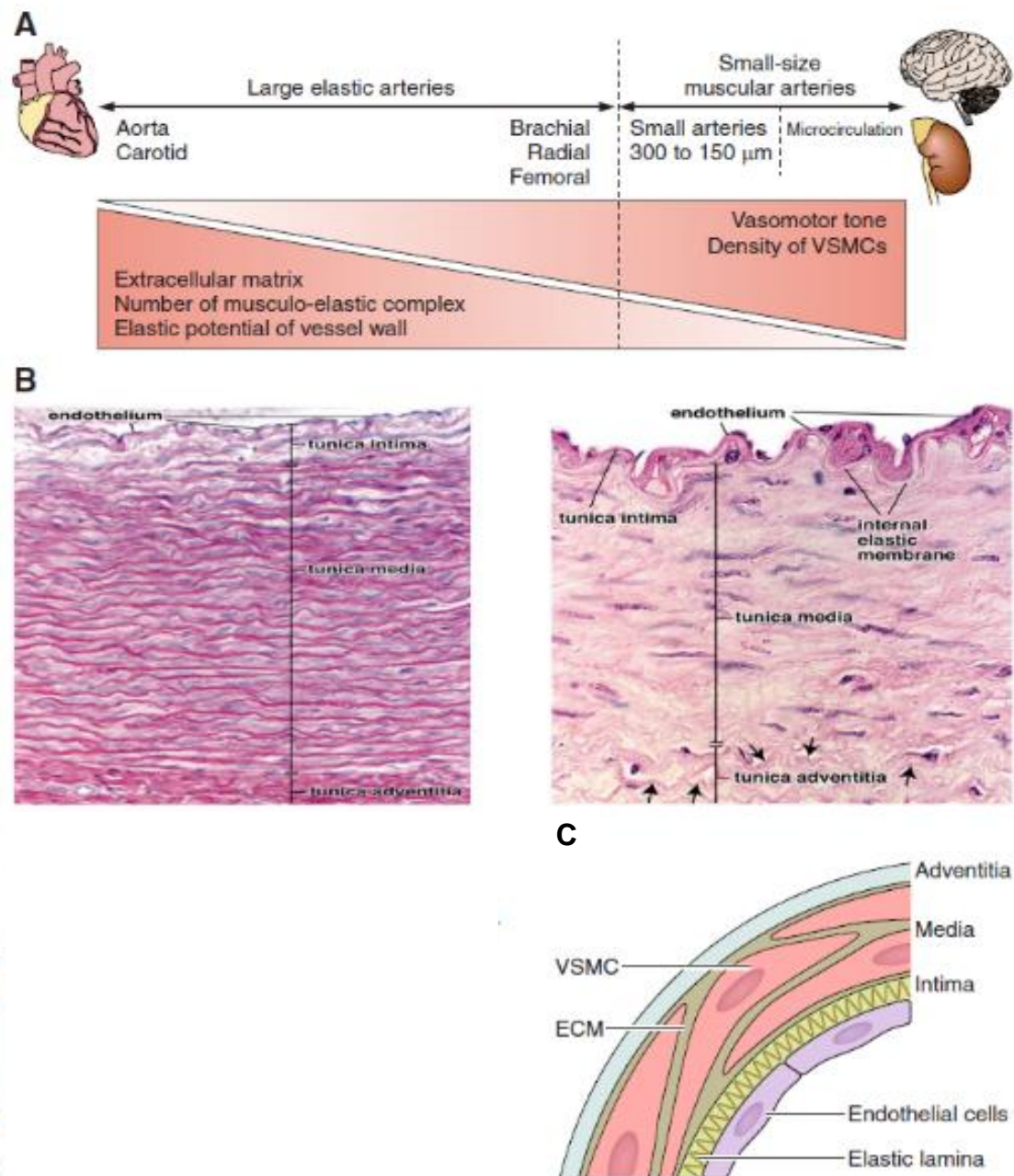
élastiques. Lorsque les artérioles se ramifient, leur diamètre diminue et le nombre de cellules musculaires lisses également. Les plus petites artérioles sont constituées d'une couche de cellules musculaires lisses.

### 2.1.2. Les mécanismes de régulations de la répartition du débit sanguin

La contraction des cellules musculaires lisses joue un rôle essentiel dans la distribution du sang dans les organes selon leurs besoins physiologiques. Divers mécanismes de contrôle extrinsèques ou intrinsèques régulent le diamètre des vaisseaux par contraction de ces cellules. Ces mécanismes entraînent une action vasomotrice des vaisseaux (capacité de contraction et de relâchement de leur paroi) qui se manifeste par une vasoconstriction (réduction du calibre du vaisseau) ou une vasodilatation (augmentation du calibre du vaisseau).

Au niveau extrinsèque, le contrôle périphérique (non cardiaque) du débit sanguin est régulé par le système nerveux. Les cellules musculaires lisses situées dans la média des vaisseaux sont directement sous l'influence du système nerveux sympathique. De manière générale, une augmentation de la stimulation sympathique entraîne une vasoconstriction des vaisseaux alors qu'une diminution de la stimulation sympathique entraîne une vasodilatation. Cependant, la réponse du système nerveux sympathique est différente pour les vaisseaux des muscles squelettiques car ces derniers sont composés de récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques. De ce fait, une augmentation de la stimulation sympathique entraîne une vasodilatation des vaisseaux des muscles squelettiques. Au niveau intrinsèque, il existe aussi un tonus myogène des vaisseaux qui est indépendant de toutes stimulations nerveuses ou hormonales. Ce tonus entraîne une vasoconstriction des vaisseaux par contraction des cellules musculaires lisses en réponse à une augmentation de la pression intravasculaire. Ce tonus s'amplifie à mesure que le calibre des vaisseaux diminue. S'il est quasi-imperceptible au niveau des artères, il est très important au niveau des artérioles et maximal au niveau des artérioles pré-capillaires. La cellule endothéliale permet également de modifier l'activité contractile des cellules musculaires lisses. En effet, le NO représente l'acteur vasoactif majeur de régulation de ce mécanisme de contrôle. Excrété par l'endothélium, le NO induit une vasodilatation locale en s'opposant à l'entrée du calcium nécessaire à la contraction des cellules musculaires lisses.

Alors que les artères musculaires possèdent une action vasomotrice, ce sont les artérioles qui jouent un rôle prépondérant dans la répartition du sang et de son débit dans un organe. Elles représentent le site principal de résistance et de régulation de la pression artérielle car une légère modification du diamètre de l'artériole modifie considérablement la pression artérielle. Ceci s'explique par la loi de Poiseuille qui montre que la résistance d'un vaisseau est inversement proportionnelle à la puissance 4 de son rayon.



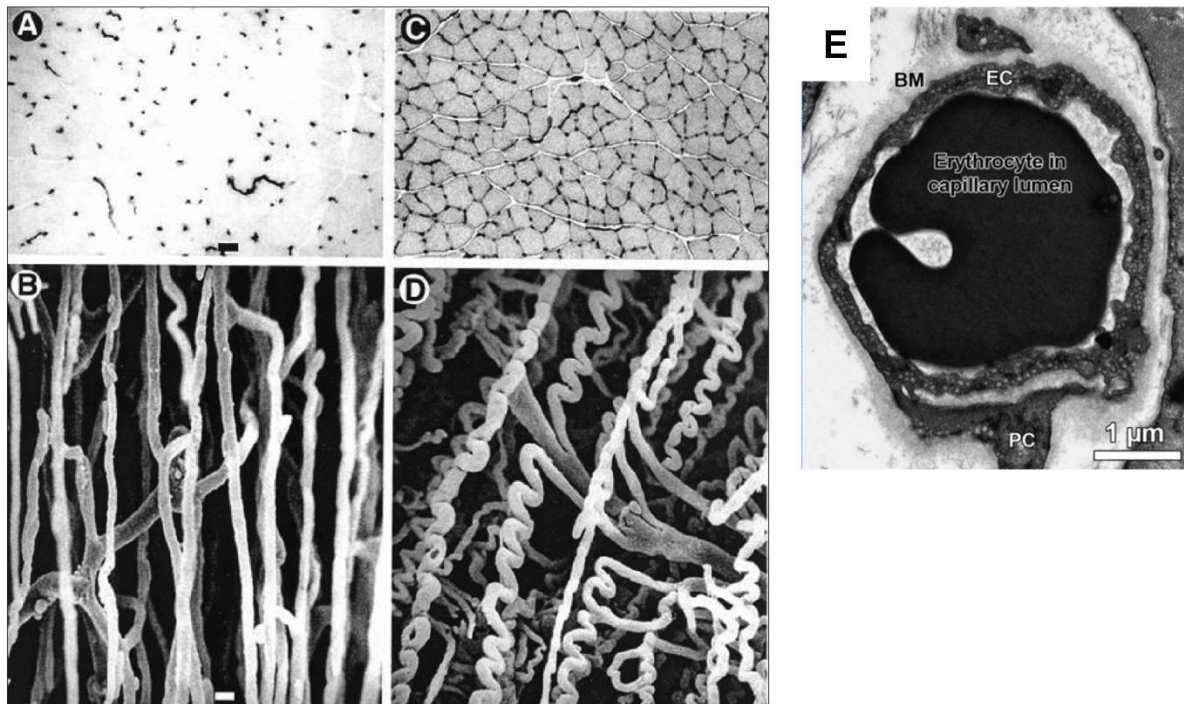
**Figure 12 : Représentation structurale et fonctionnelle de l'arbre artériel.**

A : à gauche, le triangle met en évidence que la compliance artérielle dépend de la matrice extracellulaire (ECM), du nombre de complexes musculo-élastiques et du potentiel élastique de la paroi des vaisseaux. Le rétrécissement du triangle vers la droite montre que ce potentiel élastique diminue en raison de la réduction progressive du nombre de complexes musculo-élastiques. Sur la partie droite du schéma, l'élargissement du triangle vers la droite met en évidence que la fonction vasomotrice des vaisseaux et la densité des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) augmentent à mesure que le calibre des petites artères diminue. B : à gauche, image histologique d'une grande artère élastique, montrant la stratification intima-média-adventice. Les médias sont constituées de complexes musculo-élastiques organisés de manière concentrique. A droite, image histologique d'une artère musculaire. La media est délimitée par la membrane élastique interne et externe, mais l'organisation de la média en complexes musculo-élastiques a complètement disparu. C : organisation des VSMC et de ECM au sein d'une petite artère. Les VSMC sont séparées des cellules endothéliales par des lamelles élastiques. Extraite et modifiée de Lacolley et al. (2017).

## 2.2. Capillaires

Les artérioles se ramifient à leurs extrémités en capillaires, représentant les plus petits vaisseaux sanguins. Ce sont des canaux microscopiques ayant un diamètre extérieur de 4,7 à 5,9  $\mu\text{m}$  (Eriksson & Myrhage, 1972) et une paroi très fine de l'ordre de 0,5  $\mu\text{m}$ . Les capillaires sont le véritable lieu des échanges métaboliques entre le sang et le liquide interstitiel des cellules environnantes. Les capillaires sont composés d'une simple couche de cellules endothéliales entourées d'une membrane basale avec quelques fibres de collagènes et sont dépourvus de cellules musculaires lisses. Dans l'organisme, il existe 3 types de capillaires (continus, fenêtrés et sinusoïdes) qui diffèrent par la structure de leurs cellules endothéliales. Les capillaires fenêtrés et sinusoïdes permettent une absorption importante par les pores ou par l'espace entre leurs cellules endothéliales. A l'inverse, les capillaires continus sont composés d'une couche de cellules endothéliales jointives reposant sur une lame basale continue. Il existe cependant d'étroites fentes entre ces cellules constituant des ouvertures potentielles. Contrairement à d'autres tissus de l'organisme (ligament, cartilage, tendon), le tissu musculaire squelettique est richement vascularisé et est constitué de capillaires continus qui permettent : i) l'échange de l'oxygène et de substrats énergétiques du compartiment sanguin vers les fibres musculaires, ii) l'évacuation du  $\text{CO}_2$  et des métabolites issus du métabolisme et de la contraction du compartiment musculaire vers le compartiment sanguin, iii) les échanges de nature thermique, endocrinienne et/ou osmotique. Le tissu musculaire présente également de nombreuses anastomoses entre les capillaires, impliquant une tortuosité capillaire entre les myocytes. Cette importante tortuosité capillaire permet d'augmenter considérablement la surface des échanges entre le sang et les fibres musculaires (Figure 13).





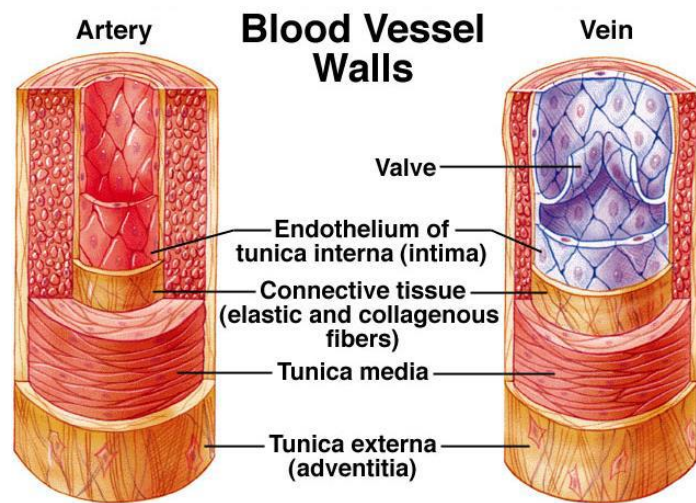
**Figure 13 : Représentation de la tortuosité capillaire en 2D et 3D ainsi que l’ultrastructure d’un capillaire.**

A et C (Représentation 2D) : Capillaires observés sur coupes transversales de fibres musculaires en microscopie optique ; B et D (Représentation 3D) : Capillaires observés après digestion des fibres musculaires en microscopie électronique à balayage. Extrait de Hudlicka et al. 2011. E : Ultrastructure d’un capillaire observé en microscopie électronique avec un globule rouge dans la lumière du vaisseau. BM : membrane basale, EC : cellule endothéliale, PC : péricytes. Extraite et modifiée de Olfert et al. (2016).

### 2.3. Veinules et veines

Le retour du sang riche en oxygène en direction du cœur s’effectue d’abord par les veinules, qui font suite aux capillaires, puis par les veines. Les veinules post-capillaires sont formées de la réunion de plusieurs capillaires. Comme pour les capillaires, leur paroi est fine, continue et dépourvue de cellules musculaires lisses. Cette particularité leur permet d’être le siège d’échanges libres entre le plasma et le fluide interstitiel. Les veinules convergent ensuite vers de plus gros vaisseaux : les veines. Les veines possèdent une mince média composée de cellules musculaires lisses. Par rapport aux artères, les veines possèdent une paroi fine, peu de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques, mais une large lumière (Figure 14). Cette dernière caractéristique entraîne peu de résistance à l’écoulement du sang vers le cœur. Par conséquent, les veines ne peuvent pas exercer une pression dynamique pour remonter le sang vers le cœur. Cette circulation peut cependant être favorisée par la présence de valvules dans les plus grosses veines des membres inférieurs. Ces valvules sont constituées d’un tissu conjonctif dense, surmonté de cellules endothéliales, correspondant à un repli de

l'intima. Sous l'effet de la pression imposée par les muscles actifs qui les entourent, elles favorisent la circulation sanguine dans le sens organe/cœur et empêchent le reflux veineux.

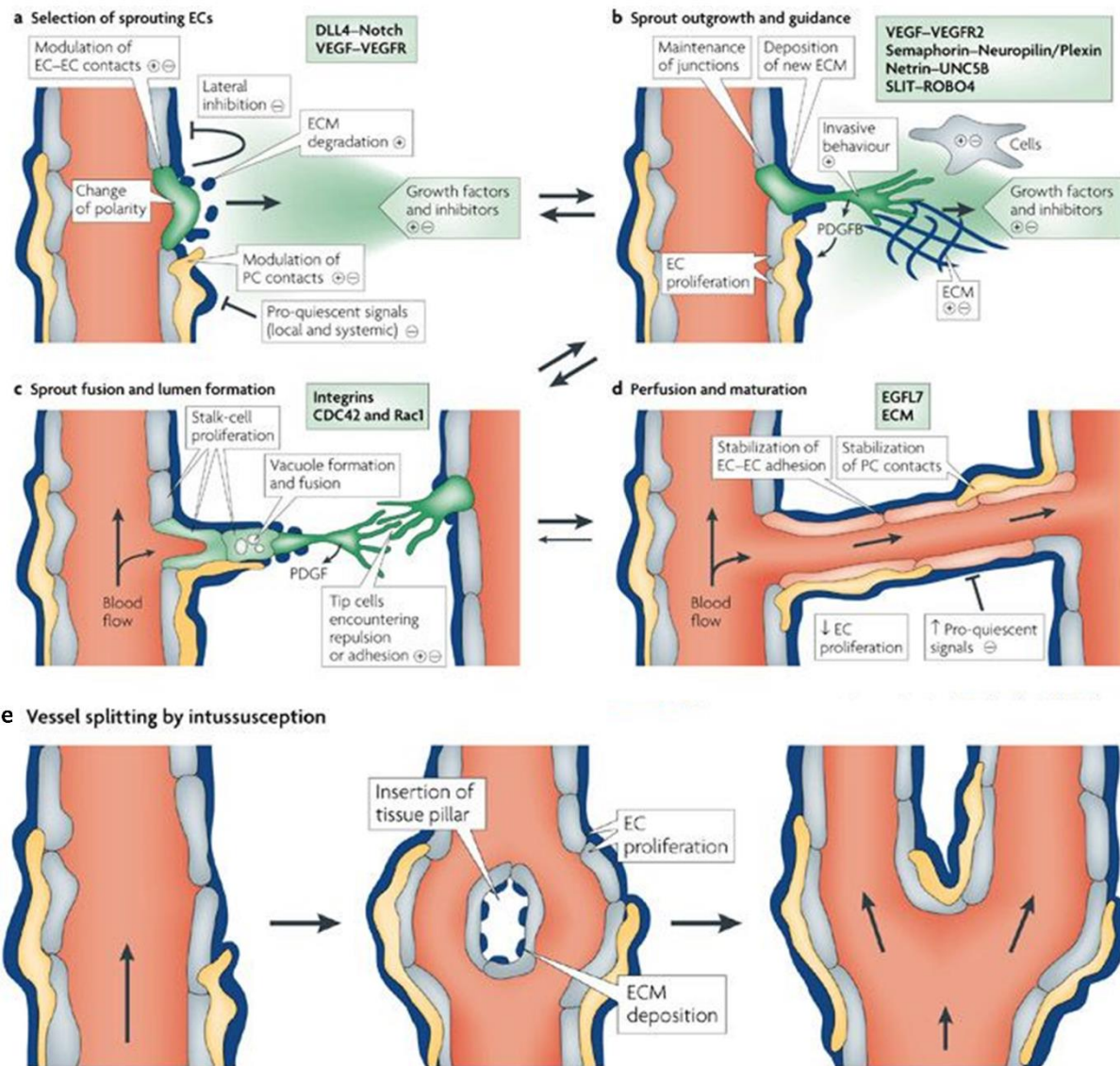


**Figure 14 : Comparaison histologique entre une artère et une veine.**  
Extraite de Widmaier et al. (2008).

#### 2.4. L'angiogénèse

Le réseau microvasculaire possède une importante plasticité en réponse à divers stress, qu'ils soient physiologiques ou pathologiques. L'homéostasie vasculaire est maintenue en équilibre par des facteurs pro-angiogéniques (*vascular endothelial growth factor*, VEGF ; *fibroblast growth factor*, FGF ; *platelet-derived growth factor*, PDGF) et angiostatiques (angiostatine, thrombospondine). Plusieurs stimuli peuvent faire pencher la balance angio-adaptative en faveur d'une croissance ou à l'inverse d'une régression vasculaire. L'angiogénèse (croissance vasculaire) peut être stimulée par un exercice physique, une ischémie et l'hypoxie (Olfert et al. 2001, Breen et al. 2008 ; Kawada & Ishii, 2008). Elle permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants suivant plusieurs étapes et selon 3 processus : par bourgeonnement ou « sprouting », par intussusception et par septation. Le processus d'angiogénèse par bourgeonnement est le mieux décrit dans la littérature. Il est initié par une dégradation locale de la membrane basale puis de la matrice extracellulaire et est suivi de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales vasculaires dans l'espace interstitiel. Ces cellules s'organisent ensuite en tubes, qui s'anastomosent en boucles vasculaires. Une membrane basale est ensuite formée par les cellules endothéliales et les péricytes (Figure 15). Au cours de l'intussusception, il y a un élargissement et une séparation des vaisseaux déjà formés (Figure 15). Lors de la septation, les cellules endothéliales poussent à l'intérieur des vaisseaux, créant des canaux vasculaires séparés (Yancopoulos et al. 2000). Ces différents processus d'angiogénèse conduisent à une augmentation de la densité capillaire et une amélioration de la distribution sanguine dans l'organe en question (Hudlicka et al. 1992 ; White et al. 1998 ; Carmeliet, 2000).





**Figure 15 : Le processus d'angiogenèse par bourgeonnement et intussusception.**

A-B-C-D : processus d'angiogenèse par bourgeonnement et E par intussusception. L'angiogenèse est contrôlée par une balance entre les facteurs pro-angiogéniques (+), tels que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), et les facteurs angiostatiques (-) tels que les péricytes (PC) (jaune), certaines molécules de la matrice extracellulaire (ECM) ou les inhibiteurs de VEGF. A : Lors de conditions favorisant l'angiogenèse, plusieurs cellules endothéliales (EC) peuvent bourgeonner (vert) alors que d'autres ne répondent pas (gris). Ces bourgeons requièrent un changement de polarité, la modulation des contacts entre EC-EC et la dégradation locale de la ECM. B : La croissance des EC est guidée par les gradients de VEGF. La libération du facteur de croissance dérivé des plaquettes B (PDGFB) par les cellules de pointe favorise le recrutement des PC vers de nouveaux bourgeons. C : les interactions adhésives ou répulsives qui se produisent lorsque les cellules de pointe se rencontrent régulent la fusion des bourgeons et des vaisseaux adjacents. La formation de la lumière dans les EC de la tige implique la fusion des vacuoles, mais d'autres mécanismes peuvent également contribuer. D : les processus de fusion aux interfaces EC-EC établissent une lumière continue. Le flux sanguin améliore l'apport d'oxygène et réduit ainsi les signaux pro-angiogéniques induits par l'hypoxie. La perfusion est également susceptible de favoriser les processus de maturation tels que la stabilisation des jonctions cellulaires, le dépôt de la matrice et la fixation des PC. E : processus d'angiogenèse par intussusception correspondant à un élargissement et une division des vaisseaux déjà formés par l'insertion d'une armature tissulaire. On sait peu de choses sur la fonction ou la régulation de ce

mécanisme de croissance intussusceptive, mais ce processus est susceptible d'impliquer la prolifération de EC, le mouvement cellulaire, la dégradation de la ECM et le dépôt de nouvelles molécules de la ECM. DLL4, ligand delta-like-4; EGFL7, facteur de croissance épidermique ligand-7; ROBO4, rond-point homologue-4; VEGFR2, récepteur VEGF-2. Extrait et modifié de Adams & Alitalo, (2007).

## 2.5. Étude de la microvascularisation du muscle

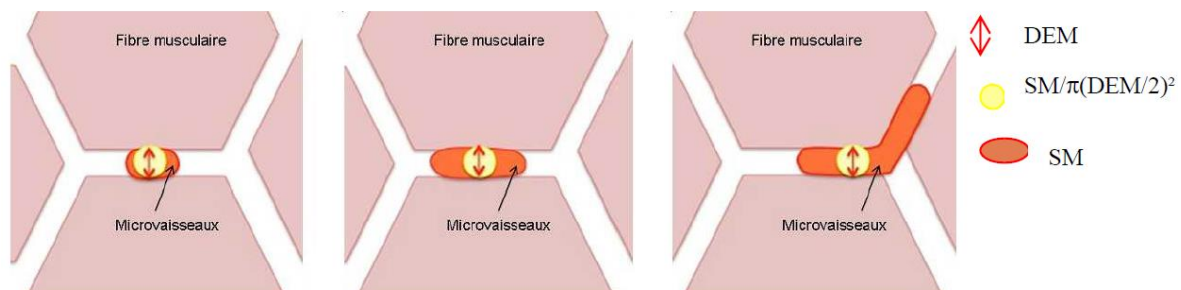
L'étude du réseau microvasculaire du muscle strié squelettique chez l'homme est le plus souvent effectuée à partir de coupes transversales de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur issues de biopsies musculaires. Si plusieurs techniques enzymatiques ou immunohistochimiques (Andersen, 1975 ; Ziada et al. 1984 ; Hansen-Smith et al. 1988 ; El-Sayed & Ramadan, 2004 ; Kadi, 2000) permettent d'analyser les microvaisseaux, la technique la plus couramment utilisée dans la littérature est le marquage immunohistochimique des molécules d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaires par l'anticorps CD31 (Dako, Glostrup, Danemark). Cette technique a été utilisée dans ce travail doctoral et a permis l'étude de la microvascularisation du muscle par la mesure de différents indices morphométriques et fonctionnels.

Deux indices généraux sont régulièrement retrouvés dans la littérature. Le premier est la densité capillaire (DC), correspondant au nombre de capillaires dans une surface donnée ( $\text{cap}/\text{mm}^2$ ) et le deuxième est l'indice C/F, de l'anglais *capillary to fibre ratio*, correspondant au nombre de capillaires divisé par le nombre de fibres préalablement délimitées. D'autres indices permettent l'analyse de l'interface et des échanges fonctionnels entre les microvaisseaux et les fibres musculaires adjacentes. Concernant les indices d'interface, le premier correspond au nombre de capillaires au contact d'une fibre musculaire (CAF). Le même microvaisseau peut donc être comptabilisé plusieurs fois. Le deuxième indice correspond au nombre de capillaires autour d'une fibre, divisé par le périmètre de cette même fibre. Proposé par Hepple en 1997 (Hepple, 1997), cet indice a été nommé le *capillary-to-fiber-perimeter exchange ratio* (CFPE). Le nombre de capillaires autour d'une fibre est ici mesuré avec un facteur correctif (*sharing factor*), lié au nombre de fibres partageant le microvaisseau. Ainsi, un microvaisseau qui est en contact avec 2 fibres aura un *sharing factor* de 1/2. Concernant les indices fonctionnels, le premier représente la distance de diffusion en prenant en compte la surface des fibres (CAFA). Il correspond à la mesure de l'indice CAF divisée par la surface de section de la fibre ( $\text{cap}/\mu\text{m}^2$ ). Le deuxième de ces indices a été mis au point par Sullivan & Pittman en 1987 (Sullivan & Pittman, 1987) et permet d'évaluer la surface d'échange disponible entre une fibre musculaire et les microvaisseaux qui l'entourent. Sa mesure consiste à diviser la somme des longueurs de capillaires au contact de la fibre (LC) par le périmètre de cette même fibre (PF) (LC/PF en %). Ce paramètre a également été utilisé comme un indice de la tortuosité capillaire (Charifi et al. 2004).

L'analyse morphométrique des microvaisseaux sur une coupe transversale aux myocytes, comprend la mesure de leur longueur, leur périmètre, leur surface de section, leurs diamètres extérieurs et intérieurs moyens, mais également leur tortuosité. Ce dernier paramètre représente un facteur important sur le plan fonctionnel car une tortuosité élevée permet d'augmenter la surface d'échange avec les fibres musculaires ainsi que le temps de transit du sang dans les capillaires au contact de ces fibres. Pour étudier ces 2 facteurs essentiels aux échanges entre le sang et la fibre musculaire, certaines études utilisent l'indice LC/PF afin de définir cette tortuosité (Charifi et al. 2004). Cependant, cet indice qui ne prend pas en compte la variation du diamètre des microvaisseaux, peut être pris en défaut et ne pas réellement refléter la longueur totale d'échange entre les 2 compartiments. Dans ce contexte, un nouvel indice (CapTor, de l'anglais *capillary tortuosity*) a été proposé par Vincent et al. (2010) dans une étude portant sur l'analyse du réseau microvasculaire de sujets porteurs du trait drépanocytaire. Après avoir constaté d'importantes variations de la surface de section des microvaisseaux, les auteurs ont proposé de se baser sur les caractéristiques propres de ceux-ci, c'est à dire la surface de section réelle comparée à la surface de section fictive (minimale théorique) d'un microvaisseau dont le modèle serait un cylindre parfait courant parallèlement aux fibres musculaires. Ainsi, sa mesure correspond à l'équation suivante :

$$\text{CapTor} = \text{surface de section du capillaire} / \pi(\text{diamètre extérieur moyen}/2)^2.$$

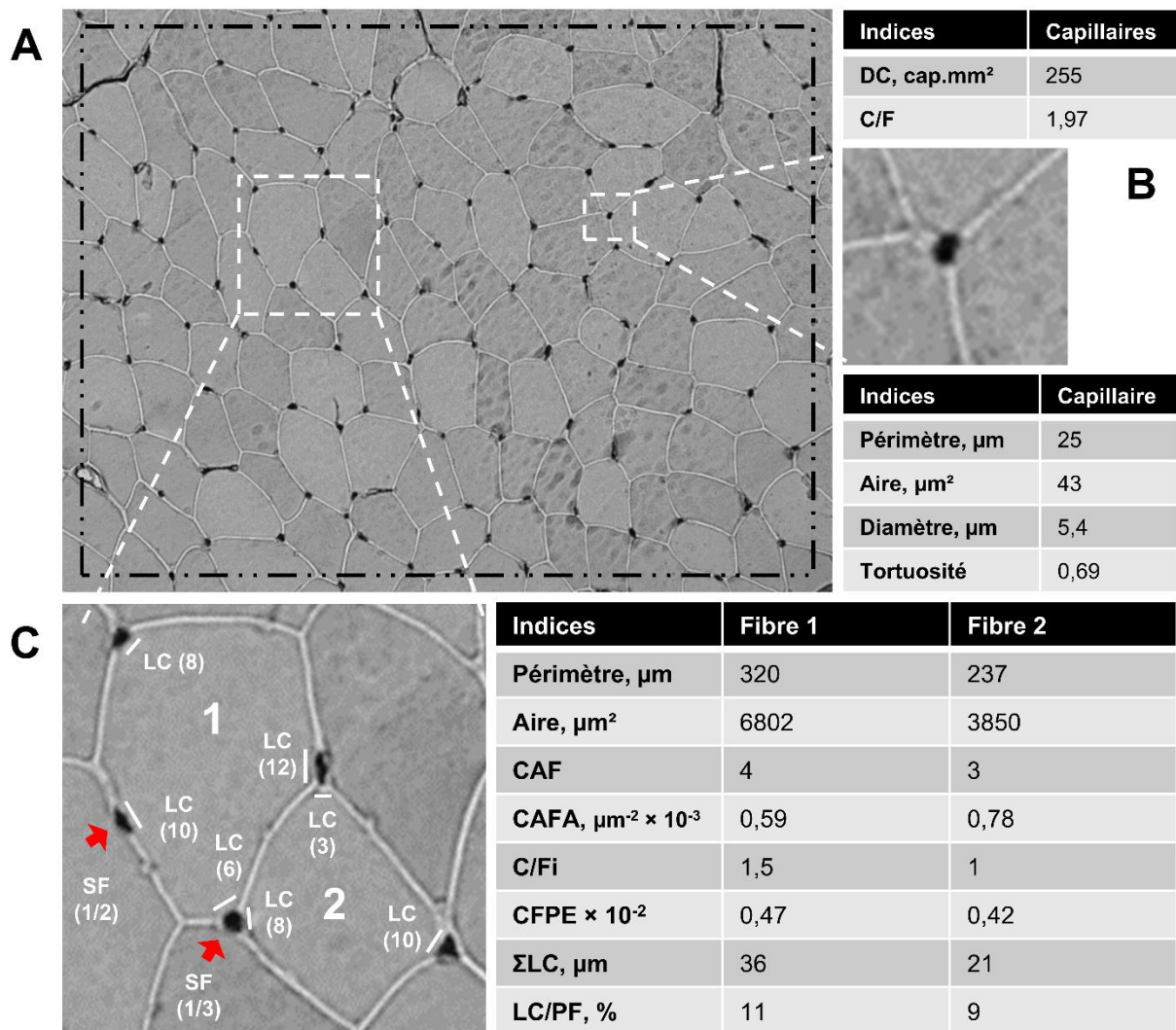
Plus ce ratio s'éloigne de 1, plus le micro-vasseau est tortueux, alors que plus il se rapproche de 1, plus ce microvaisseau est droit et parallèle aux fibres musculaires (Figure 16).



**Figure 16 : Représentation de la méthode de calcul de l'indice CapTor.**

DEM, diamètre extérieur moyen ; SM, surface de section. Extraite et modifiée de Vincent et al. (2010).

Les mesures des autres indices cités dans cette partie sont schématisées dans la Figure 17. La méthode d'obtention des indices microvasculaires utilisés dans ce travail doctoral, est développée dans la partie « Matériel et Méthode ».



**Figure 17 : Mesure des indices microvasculaires.**

A : coupe histologique transversale aux myocytes, mettant en évidence des capillaires par un marquage CD31. Le rectangle noir représente une zone où sont mesurés les indices généraux : la densité capillaire (DC) et l'indice capillaire par fibre (C/F). Pour C/F, seules les fibres intégralement présentes dans la zone sélectionnée sont prises en compte dans le calcul. Les valeurs de ces 2 indices sont présentées dans le tableau en haut à droite. B : zoom sur 1 capillaire permettant la mesure de sa surface, de son périmètre, de son diamètre et de sa tortuosité. C : zoom sur 2 fibres musculaires en coupe transversale, permettant la mesure des indices d'interface (CAF et CFPE) et d'échange fonctionnel (CAFA et LC/PF) entre chaque fibre et les micro-vaisseaux voisins. Les flèches rouges indiquent 2 exemples de *sharing factor* appliqués à des micro-vaisseaux.

### 3. Le métabolisme énergétique

Le muscle squelettique est un organe majeur pouvant produire et consommer de l'énergie. La contraction du muscle nécessite l'utilisation d'une quantité importante d'énergie qui provient de la synthèse continue d'ATP. Une molécule d'ATP est composée d'une molécule d'adénosine (molécule d'adénine liée à une molécule de ribose) combinée à 3 Pi. La liaison entre les 2 derniers phosphates est une liaison riche en énergie. Sa rupture par hydrolyse, par

l'enzyme ATPase, libère l'énergie préalablement stockée dans la liaison. L'ATP est ainsi transformée en adénosine diphosphate (ADP), Pi et énergie selon l'équation suivante :



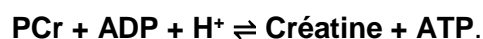
Cette équation est réversible : l'ajout d'un Pi à l'ADP entraîne la resynthèse de l'ATP. Si ces réactions se produisent en l'absence d'oxygène, on parle de métabolisme anaérobie alors qu'en présence d'oxygène on parle de métabolisme aérobie. La resynthèse de l'ATP peut s'effectuer par plusieurs voies métaboliques :

- La filière anaérobie alactique correspondant à la voie des phosphagènes
- La filière anaérobie lactique correspondant au système glycolytique
- La filière aérobie correspondant au système oxydatif

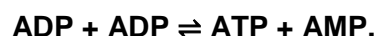
### 3.1. La filière anaérobie alactique

La filière anaérobie alactique correspond au système énergétique le plus simple et le plus rapide. Bien que sa capacité à resynthétiser de l'ATP soit limitée par son faible stock de substrats, sa mise en route est cependant immédiate. L'ATP produit par cette filière contribue à la fourniture d'énergie pour des efforts très courts et très intenses, tels que le sprint, ou inférieurs à 10 secondes.

Les substrats utilisés sont les phosphogènes, des composés phosphorés labiles découverts par Eggleton en 1927 (Eggleton & Eggleton, 1927). Ils libèrent une molécule d'acide phosphorique lors de l'hydrolyse. Le tissu musculaire contient 2 composés phosphorés riches en énergie : la phosphocréatine (PCr) et l'ATP. La rupture de la liaison phosphate de la PCr par l'enzyme créatine kinase (CK) permet de séparer la créatine du Pi. Le Pi est alors transféré sur l'ADP et permet, par conséquent, de reformer de l'ATP :



Cette réaction est réversible, la CK est donc également impliquée dans la resynthèse de PCr à partir de l'ATP afin de recréer les réserves de PCr. La PCr représente un réservoir d'énergie supplémentaire, même si sa quantité est très limitée (5 mmol/kg de muscle frais). Egalement, pour former rapidement des petites quantités d'ATP, il existe une autre voie qui consiste à transférer un phosphate d'une molécule d'ADP à une autre. Cette réaction est catalysée par l'enzyme myokinase (MK) (également connue sous le nom d'adénylate kinase) et donne une molécule d'adénosine monophosphate (AMP) et un ATP :



Ce système intervient surtout en relais lorsque les réserves de PCr sont épuisées.

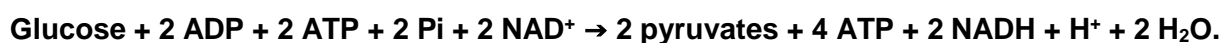


### 3.2. La voie anaérobie lactique : glycolyse et glycolyse

La filière anaérobie lactique est un système énergétique plus complexe. Comme pour la filière anaérobie alactique, elle ne fournit pas de grandes quantités d'ATP mais sa mise en route reste assez rapide. Ainsi, les actions combinées des filières anaérobies alactiques et lactiques permettent une fourniture d'énergie considérable pendant les 2 premières minutes d'un exercice.

#### 3.2.1. Le système glycolytique

Lors d'un exercice à haute intensité, la plus grande partie de l'énergie issue des hydrates de carbone provient du glucose stocké en réalité sous forme de glycogène intramusculaire alors qu'une plus petite partie provient directement du glucose plasmatique. Le passage du glucose plasmatique à la cellule musculaire est possible par la translocation des transporteurs du glucose, qui migrent du cytoplasme vers la membrane plasmique. Dans le muscle humain, on retrouve principalement l'isoforme 4 des transporteurs du glucose : GLUT4 (Huang & Czech, 2007). Dans le système glycolytique, la fourniture d'énergie passe par un processus qui dégrade une molécule de glucose à 6 carbones en 2 molécules de pyruvate à 3 carbones, par le biais de 10 réactions enzymatiques successives se déroulant dans le cytoplasme des cellules. Le glycogène, stocké dans le foie ou dans le muscle, est dégradé et phosphorylé en glucose-1-phosphate (G-1-P) par l'enzyme phosphorylase (ou myophosphorylase) au cours de la glycolyse. Le G-1-P est ensuite transformé en glucose-6-phosphate (G-6-P) rejoignant ainsi la glycolyse. Quant au glucose entrant dans la cellule, il est directement phosphorylé en G-6-P par l'enzyme hexokinase (HK) qui initie ainsi la glycolyse. Cependant, cette dernière réaction de phosphorylation nécessite l'apport d'un ATP. Le G-6-P issu du glycogène ou du glucose est ensuite converti en fructose-6-phosphate, puis est phosphorylé en fructose 1,6-biphosphate par l'enzyme phosphofructokinase (PFK). Cette dernière étape nécessite également l'hydrolyse d'un ATP. Le glucose à 6 carbones est ensuite scindé en 2 fragments à 3 carbones par l'enzyme aldolase. S'ensuit une série de déshydrogénations et de réactions de phosphorylation des substrats aboutissant à 2 molécules de pyruvate et à la synthèse de 4 ATP (Figure 18). On peut résumer la glycolyse par l'équation suivante :



Où NAD, nicotinamine adénine dinucléotide ; NADH + H<sup>+</sup>, NAD réduit ; NAD<sup>+</sup>, NAD oxydé.

Afin que la glycolyse se poursuive, le NAD doit être régénéré car sa quantité est limitée. Lors d'un exercice à faible intensité, le NAD est régénéré par oxydation dans la mitochondrie. Cependant, lorsque l'intensité de l'exercice augmente, l'oxydation du NADH + H<sup>+</sup> en NAD<sup>+</sup> est

possible grâce à la conversion de l'acide pyruvique en acide lactique par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH), c'est la filière anaérobie lactique (Figure 18). Au cours d'un exercice d'intensité croissante, la concentration sanguine du lactate augmente de manière quasi exponentielle (Messonnier et al. 1997 ; Vallier et al. 2000 ; Messonnier et al. 2001 ; Messonnier et al. 2013). Toutefois, cette évolution permet de déterminer 2 seuils lactiques correspondants à des changements de vitesse de l'accumulation sanguine du lactate. A titre d'indication, les premiers et seconds seuils lactiques interviennent respectivement pour des concentrations d'environ 2 mmol/L et 4 mmol/L pour un exercice sur cycloergomètre (Heck et al. 1985) mais ces valeurs peuvent varier en fonction de l'activité (masse musculaire impliquée) (Beneke et al. 1995) par exemple.

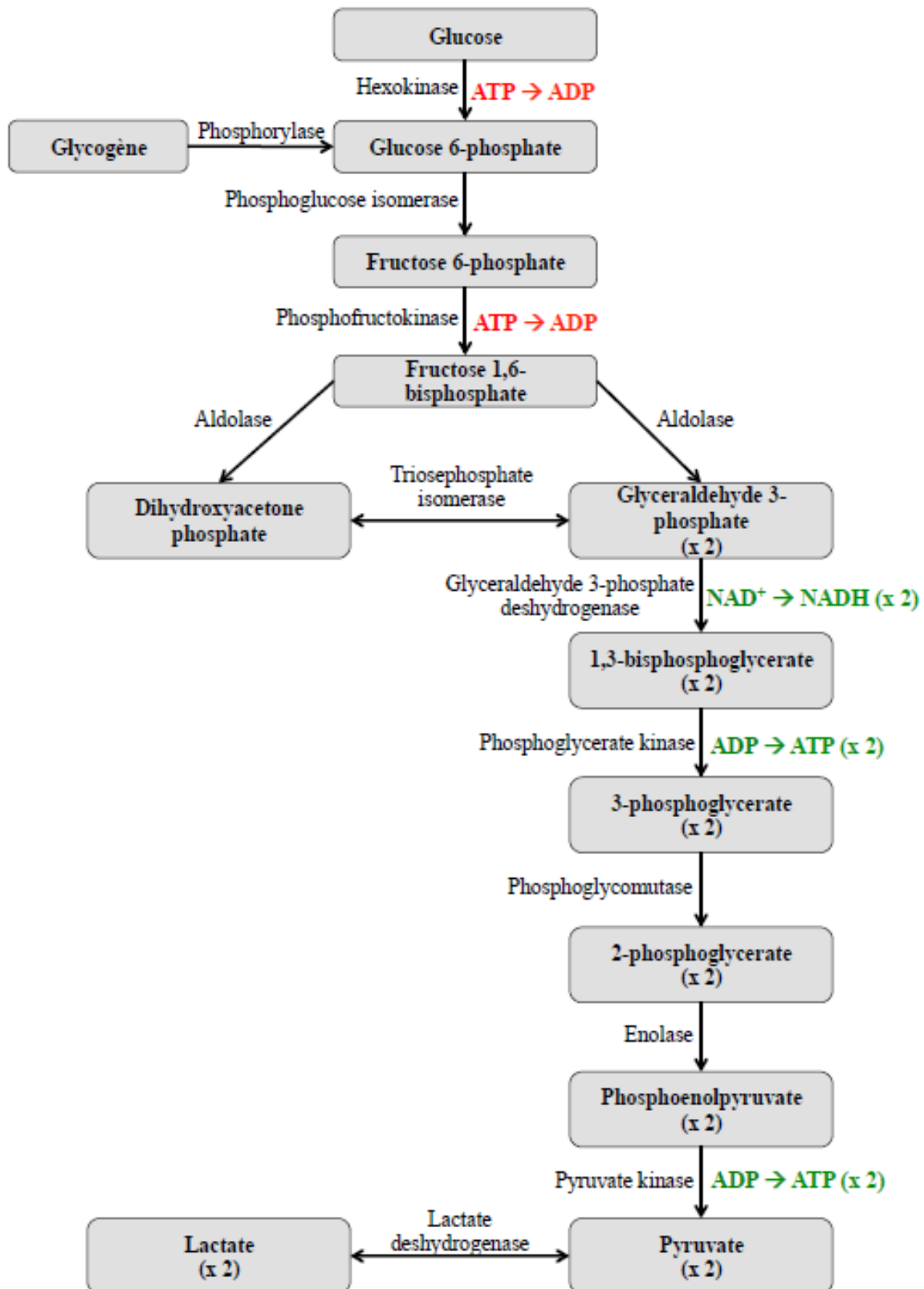


Figure 18 : Voie anaérobie lactique de la glycogénolyse et de la glycolyse.  
 Extraite de la thèse de B. Chatel



### 3.2.2. Devenir de l'acide lactique

Le facteur limitant de la filière anaérobie lactique est l'accumulation d'acide lactique dans les cellules musculaires. En effet, lors d'un exercice très intense pouvant aller jusqu'à 2 minutes, la concentration d'acide lactique musculaire peut passer de 1 à 25 mmol/kg. Cette forte accumulation de lactate est accompagnée d'une acidose. Il existe plusieurs théories pour expliquer le lien étroit entre acidose et accumulation de lactate. Pour certains, la glycolyse produit de l'acide lactique et comme la constante d'acidité de cette molécule ( $pK_a = 3,9$ ) est très éloignée des valeurs physiologiques de pH, l'acide lactique va avoir tendance à se dissocier en ions lactate et hydrogène ( $H^+$  ou proton) à hauteur de 99,5% (Mainwood & Renaud, 1985). En d'autres termes, c'est la dissociation de l'acide lactique qui serait la cause de l'acidose (Boning et al. 2005 ; Marcinek et al. 2010). Pour d'autres, la glycolyse produit du lactate mais cette production est proportionnelle au turnover de l'ATP dont l'hydrolyse produit des ions  $H^+$  et donc est source d'acidose (Robergs et al. 2005). Selon un troisième concept, toute production d'anion fort tel que le lactate doit s'accompagner, pour préserver l'électroneutralité du milieu, d'un cation, et ce cation est le  $H^+$  (Lindinger et al. 2005). Quel que soit le concept, tous s'accordent à dire que toute accumulation de lactate s'accompagne (de manière directe ou indirecte selon le concept) d'une accumulation d'ions  $H^+$  et donc d'une acidose (Robergs et al. 2004, 2005 ; Boning et al. 2005 ; Marcinek et al. 2010 ; Lindinger et al. 2005). La concomitance entre accumulation de lactate et baisse de pH est un fait expérimental observé à de très nombreuses reprises *in vivo* (Hermansen & Osnes ; 1972 ; Sahlin et al. 1976 ; Marcinek et al. 2010). L'acidose musculaire aboutit, entre autres, à une diminution de l'activité des enzymes clés de la glycolyse (Chasiotis et al. 1983) réduisant ainsi le débit de resynthèse de l'ATP par cette voie (pour revue, Messonnier & Dubouchaud, 2010). L'acidose pourrait également intervenir dans la perturbation des mécanismes contractiles (Fitts, 1994 ; Sundberg et al. 2018). Plusieurs mécanismes de régulation du pH permettent l'élimination intramusculaire des ions lactate et  $H^+$ . On peut classer ces mécanismes selon 3 catégories : les mécanismes tampons intrinsèques, les mécanismes tampons liés au bicarbonate et les mécanismes de transports membranaires du proton (Juel, 2008) (Figure 19).

- Les mécanismes tampons intracellulaires

Deux mécanismes de tamponnage des ions  $H^+$  au niveau intracellulaire peuvent intervenir afin de réguler le pH intramusculaire : les mécanismes bicarbonates-dépendant et les mécanismes intrinsèques.

Les mécanismes tampons par le bicarbonate représentent le plus important mécanisme de régulation du pH. Il permet le tamponnage des ions  $H^+$  par le bicarbonate ( $HCO_3^-$ )

aboutissant à la formation de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>O. Ces réactions sont catalysées par les enzymes anhydrases carboniques (CA) cytosoliques II (CAII) et III (CAIII) (Geers & Gros, 2000) :

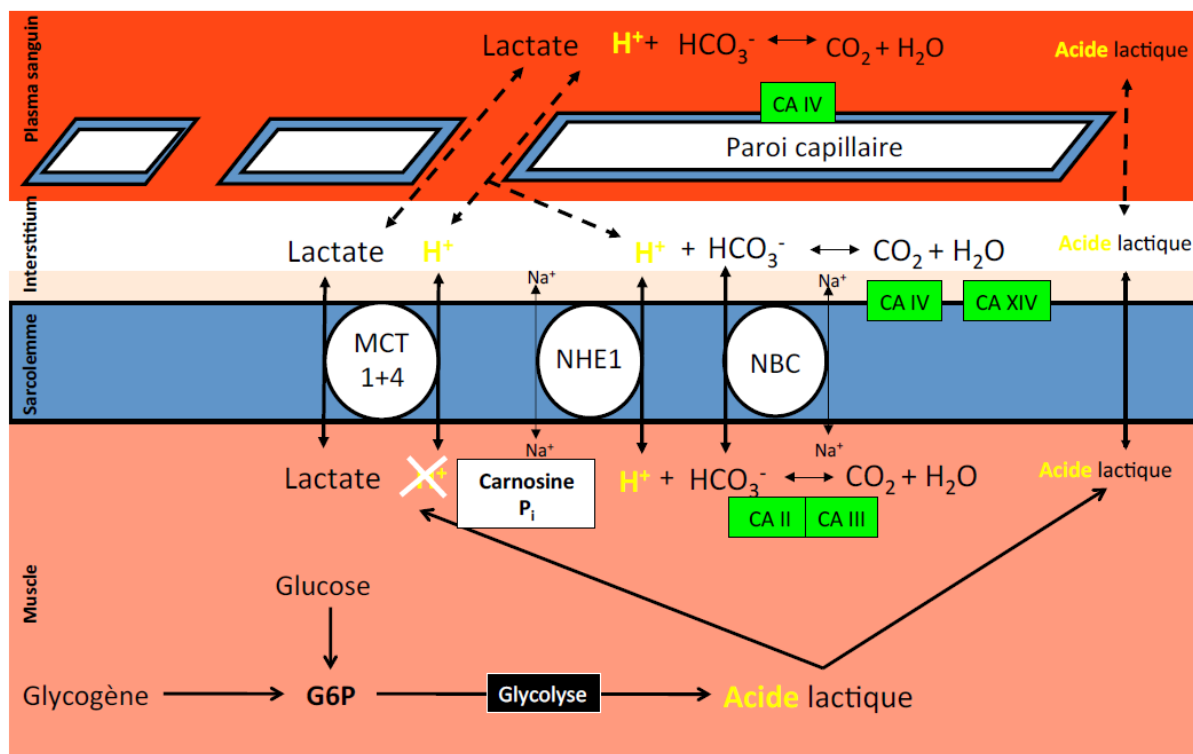


Cette réaction permettrait de repousser la baisse du pH musculaire en réponse à un exercice intense (Messonnier et al. 2007). Le co-transporteur sodium (Na<sup>+</sup>)/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (NBC) et CAII, par son action non-catalytique, favoriserait le transport des ions lactates et H<sup>+</sup> par les transporteurs monocarboxylates (MCTs) 1 (MCT1), et par MCT1 et MCT4 respectivement, en jouant sur le gradient de concentration (Becker et al. 2004 ; Becker & Deitmer, 2008 ; Becker et al. 2010 ; Becker et al. 2011 ; Noor et al. 2017 ; Stridh et al. 2012).

Les mécanismes tampons intrinsèques régulent le pH intramusculaire par le tamponnage des ions H<sup>+</sup> par des protéines telles que la carnosine et le Pi (Abe, 2000). Si la contribution de ces mécanismes tampon restet encore très discutée dans la littérature, il semblerait qu'une augmentation de la concentration intracellulaire en Pi favoriserait le pouvoir tampon intrinsèque (Pathare et al. 2008). A l'exercice, Baguet et al. (2010) ont montré qu'une concentration élevée en carnosine était fortement corrélée à une meilleure performance en aviron, ce qui suppose que ces mécanismes tampon soient fortement impliqués dans la régulation du pH à l'exercice.

- Les mécanismes de transports membranaires

Au repos, le pH intramusculaire est majoritairement régulé par l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE1) qui entraîne l'efflux d'H<sup>+</sup> de la cellule musculaire (Aickin & Thomas, 1977 ; Juel, 2008). Lors d'un exercice intense, il semblerait que la régulation du pH intramusculaire soit plutôt prise en charge par les MCTs plutôt que par l'activité de NHE1 (Aickin & Thomas, 1977 ; Juel, 2008). Ces MCTs transportent ces ions de part et d'autre de la membrane du sarcolemme (Juel, 2008). Dans le muscle squelettique, on retrouve principalement 2 isoformes des MCTs : MCT1 et MCT4 qui assurent le symport d'un monocarboxylate et d'un H<sup>+</sup> dans la même direction avec un ratio de 1 : 1 (McCullagh et al. 1996 ; Juel, 1997 ; Pilegaard et al. 1999 ; Yoshida et al. 2004 ; Halestrap & Wilson, 2012 ; Lindinger et al. 2013). Les fortes accumulations intramusculaires en ions lactate et H<sup>+</sup>, subséquentes à un exercice intense, entraînent un gradient de concentration favorable à l'efflux des ions de ces muscles actifs par les MCTs (Juel, 1997 ; Juel, 2001 ; Juel, 2008 ; Halestrap, 2012 ; Halestrap & Wilson, 2012 ; Halestrap, 2013).



**Figure 19 : Représentation schématique des mécanismes de régulation du pH intramusculaire.**

CA, anhydrase carbonique ;  $\text{CO}_2$ , dioxyde de carbone ; G6P, glucose-6-phosphate ;  $\text{H}^+$ , proton ;  $\text{H}_2\text{O}$ , eau ;  $\text{HCO}_3^-$ , ion bicarbonate ; MCT, transporteur de monocarboxylate ;  $\text{Na}^+$ , sodium ; NBC, co-transporteur bicarbonate/sodium ; NHE1, échangeur sodium/proton ;  $\text{P}_i$ , phosphate inorganique. Le proton barré correspond au tamponnage intrinsèque (notamment par la carnosine et le phosphate inorganique). Extraite de la thèse de B. Chatel. Figure modifiée de Messonnier et al. (2007).

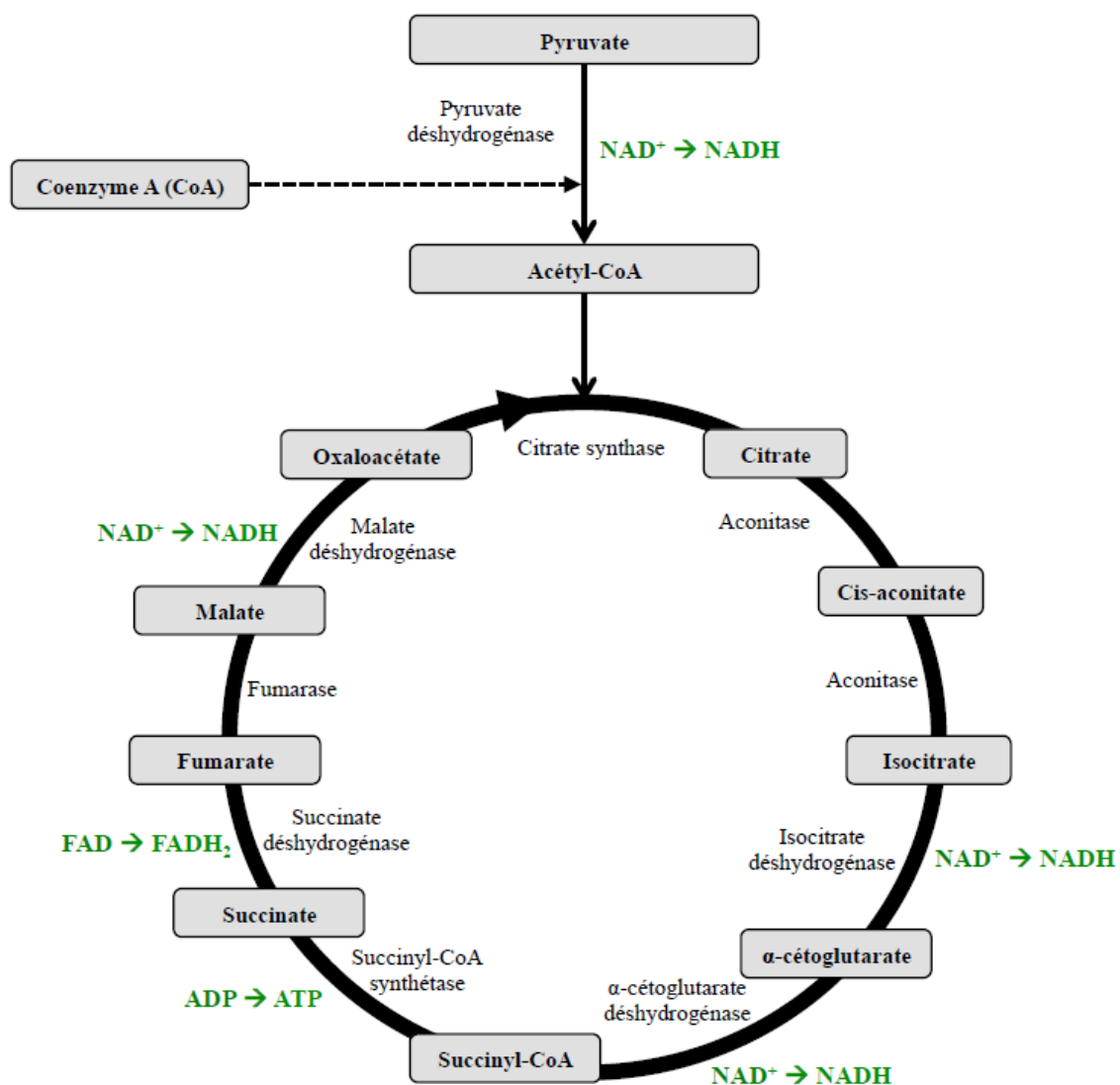
### 3.3. La voie aérobie

Le métabolisme oxydatif est un processus encore plus complexe. Contrairement aux filières anaérobies alactiques et lactiques, son rendement énergétique est très élevé mais sa production d'ATP est nettement plus lente. Ainsi, les actions combinées de ces 3 filières permettent une fourniture d'énergie sur plusieurs heures et une utilisation efficace des réserves d'énergies puisque la dégradation complète d'une molécule de glucose produit 38 ATP.

#### 3.3.1. La glycolyse aérobie

La glycolyse génère du pyruvate. En présence d'oxygène (condition aérobie), ce substrat peut rentrer dans une voie métabolique permettant de poursuivre sa dégradation et la fourniture d'ATP. Cette poursuite du métabolisme du pyruvate se déroule à l'intérieur de la mitochondrie. Avant d'entrer dans le cycle de Krebs, le pyruvate est d'abord décarboxylé en

un fragment à 2 carbones, grâce à une série d'enzymes connue sous le nom de complexe pyruvate déshydrogénase, et liée au coenzyme A (CoA) afin de former l'acétyl-CoA. Cette réaction permet la réduction d'un  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Par la suite, l'acétyl-CoA rentre dans le cycle de Krebs. La première étape consiste à former du citrate (molécule à 6 carbones) à partir de l'acétyl-CoA, de l'oxaloacétate (dernière molécule du cycle, à 4 carbones) et à libérer le CoA sous l'action de l'enzyme citrate synthase (CS). La CS est une enzyme clé du cycle de Krebs. S'ensuit une série de réactions de déshydratation et de décarboxylation aboutissant à la production de 3  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , 1 flavine adénine dinucléotide réduite ( $\text{FADH}_2$ ), 1 ATP et du  $\text{CO}_2$ . Le cycle revient enfin à son point de départ, l'oxaloacétate, où ce dernier pourra se combiner avec un autre acétyl-CoA pour un cycle suivant (Figure 20).

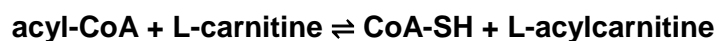


**Figure 20 : Le cycle de Krebs**  
Extrait de la thèse de B. Chatel

### 3.3.2. La lipolyse et la $\beta$ -oxydation

Les lipides, présents en grand nombre dans l'organisme, constituent également un substrat dont la dégradation permet de resynthétiser de l'ATP. Alors que de nombreux composés chimiques constituent les lipides, seuls les triglycérides constituent de véritables sources d'énergie. Stockés dans les cellules adipeuses et dans les fibres musculaires sous forme de gouttelettes lipidiques, les triglycérides sont dégradés en 1 molécule de glycérol et 3 molécules d'acides gras par des lipases hormono-sensibles (HSL) et les triglycérides lipases (ATGL) afin d'être utilisés. Les acides gras issus de la lipolyse sont ensuite métabolisés principalement par le biais de 2 voies : la  $\beta$ -oxydation et la cétogenèse. Nous développerons ici uniquement la  $\beta$ -oxydation car cette voie intervient lors d'un exercice physique prolongé alors que la voie de la cétogenèse intervient principalement en période de jeûne prolongé ou de diabète.

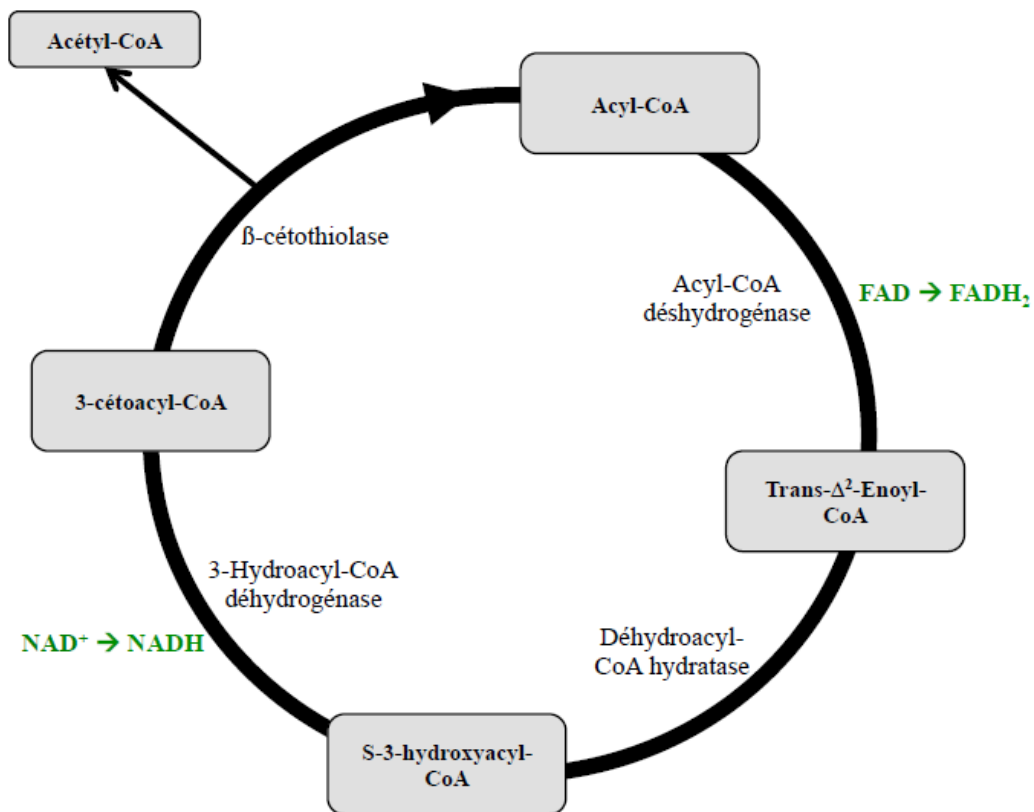
La  $\beta$ -oxydation entraîne la dégradation des acides gras dans la matrice mitochondriale des cellules musculaires et provoque i) la production d'acétyl-CoA dont le groupe acétyl peut être oxydé dans le cycle de Krebs et ii) la production de coenzymes réduits ( $\text{FADH} + \text{H}^+$  et  $\text{NADH} + \text{H}^+$ ) dont les électrons peuvent alimenter la chaîne respiratoire et dont le fonctionnement sera abordé ci-après. Cette  $\beta$ -oxydation fait intervenir 4 réactions. La première correspond à l'activation des acides gras en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase qui crée une liaison entre le groupement carboxyle de l'acide gras et le groupe thiol du CoA. L'activation des acides gras à chaînes carbonées courtes en acyl-CoA peut être réalisée dans la matrice mitochondriale, car ils peuvent diffuser à travers les membranes mitochondriales. Cependant, les membranes mitochondriales sont imperméables aux acides gras à chaînes carbonées longues. Ces derniers sont donc activés en acyl-CoA dans le cytoplasme et franchissent les membranes en se convertissant en acyl-carnitine par l'association à la L-carnitine.



L'entrée dans la matrice mitochondriale s'effectue par les carnitines acyltransférases et plus particulièrement par la carnitine O-palmitoyltransférases I. Une fois parvenue dans la matrice, la carnitine O-palmitoyltransférase II reconvertit l'acyl-carnitine en acyl-CoA qui rejoint alors la  $\beta$ -oxydation dans la matrice mitochondriale. La troisième étape de la  $\beta$ -oxydation consiste en la déshydrogénation de la  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA conduisant à la formation de  $\beta$ -cétoacyl-CoA grâce à l'enzyme  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase ( $\beta$ -HAD). La dégradation complète de l'acide gras se poursuit jusqu'à ce que la chaîne carbonée soit complètement découpée en molécules d'acétyl-CoA. Chaque cycle de  $\beta$ -oxydation raccourcit l'acyl-CoA de 2 atomes de carbone et libère une molécule d'acétyl-CoA, une molécule de  $\text{FADH}_2$  et une molécule de  $\text{NADH} + \text{H}^+$  (Figure 21). Ainsi, pour un acide gras formé de 16 carbones, la  $\beta$ -oxydation forme

8 molécules d'acide acétique, qui sont ensuite converties en 8 molécules d'acétyl-CoA qui pourront rejoindre le cycle de Krebs.

La formation d'ATP par la  $\beta$ -oxydation des acides gras nécessite un certain délai et une intensité d'exercice nettement sous-maximale. En revanche, sa réserve d'énergie est très importante.



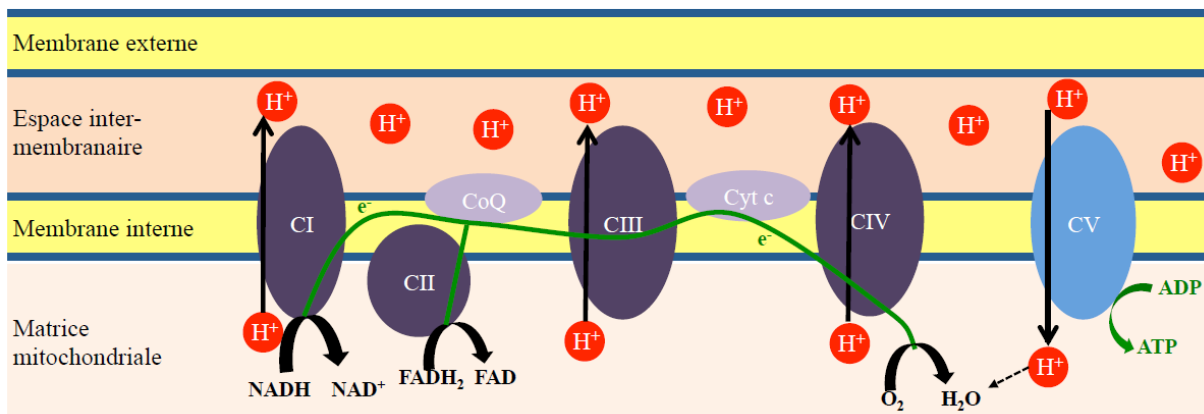
**Figure 21 :  $\beta$ -oxydation ou hélice de Lynen**  
Extrait de la thèse de B. Chatel

### 3.3.3. La chaîne respiratoire mitochondriale

La chaîne respiratoire est une chaîne de transport des électrons réalisant l'oxydation des coenzymes réduits ( $\text{NADH} + \text{H}^+$  et  $\text{FADH}_2$ ) produits dans le cytoplasme (lors de la glycolyse) ou dans la matrice mitochondriale (lors de la  $\beta$ -oxydation et du cycle de Krebs) afin de resynthétiser de l'ATP. Cette chaîne respiratoire, localisée sur la membrane interne de la mitochondrie, est constituée d'enzymes membranaires et d'une succession de complexes protéiques transporteurs d'électrons. Elle récupère et transporte les électrons issus de l'oxydation du  $\text{NADH} + \text{H}^+$  et du  $\text{FADH}_2$  tout le long de la chaîne respiratoire. L'oxydation du  $\text{NADH} + \text{H}^+$  en  $\text{NAD}^+$  est réalisée au niveau du complexe I (CI, ou NADH coenzyme Q oxydoréductase), où la récupération de 2 électrons va apporter l'énergie nécessaire à la

translocation active de 4 H<sup>+</sup> de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. L'oxydation du FADH<sub>2</sub> en FAD est réalisée au niveau du complexe II (CII, ou succinate coenzyme Q oxydoréductase), où 2 électrons sont récupérés. A l'inverse du CI, le CII n'a pas la faculté de transférer des H<sup>+</sup>. Les électrons récupérés à l'issue de ces 2 entrées par CI et CII, sont ensuite transférés au complexe III (CIII, coenzyme Q - cytochrome c oxydoréductase) par l'intermédiaire du coenzyme-Q (CoQ ou ubiquinone), puis au complexe IV (CIV, cytochrome c oxidase ou COx) par l'intermédiaire du COx. Le passage des électrons au niveau de CIII et de CIV va respectivement permettre le transfert de 4 puis 2 H<sup>+</sup> de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Au niveau du CIV, les électrons se combinent à une molécule d'oxygène permettant la formation de 2 molécules d'H<sub>2</sub>O. Les H<sup>+</sup> expulsés hors de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire au niveau du CI, CIII et CIV vont créer de part et d'autre de la membrane un gradient de concentration en H<sup>+</sup> et un gradient électrochimique à travers la membrane mitochondriale interne, la face matricielle devenant négative et l'espace intermembranaire positif. Ce gradient électrochimique emmagasine l'énergie libérée par les oxydations successives, permettant ainsi la phosphorylation de l'ADP en ATP par les enzymes ATPases. En effet, ce gradient provoque l'efflux des H<sup>+</sup> depuis l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale par l'intermédiaire du complexe V (CV, ATP synthétase, complexe F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>). F<sub>0</sub> est un canal transmembranaire qui laisse passer sélectivement les protons et F<sub>1</sub> contient le site catalytique responsable de la synthèse de l'ATP. Ce processus est nommé la phosphorylation oxydative (Figure 22). La diffusion de 3 H<sup>+</sup> à travers le CV permet d'apporter l'énergie nécessaire à la resynthèse d'une molécule d'ATP. Ainsi, l'oxydation d'un NADH + H<sup>+</sup> permet la formation de 3 ATP, contre seulement 2 pour le FADH<sub>2</sub>.

Cependant, une faible partie des électrons transitant le long de la chaîne respiratoire peut également fuir et s'associer avec l'oxygène, formant alors des molécules très réactives, telles que l'anion superoxyde et les radicaux hydroxyles. En s'associant avec d'autres molécules elles peuvent former des espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS), susceptibles de réagir avec les protéines, la membrane des phospholipides et les acides nucléiques. Une production élevée de ROS provoque un déséquilibre de la balance antioxydant/pro-oxydant, conduisant à un stress oxydant (Sies & Cadenas, 1985 ; Powers & Jackson, 2008) et entraînant divers dommages au niveau de la structure et de la fonctionnalité de la mitochondrie.

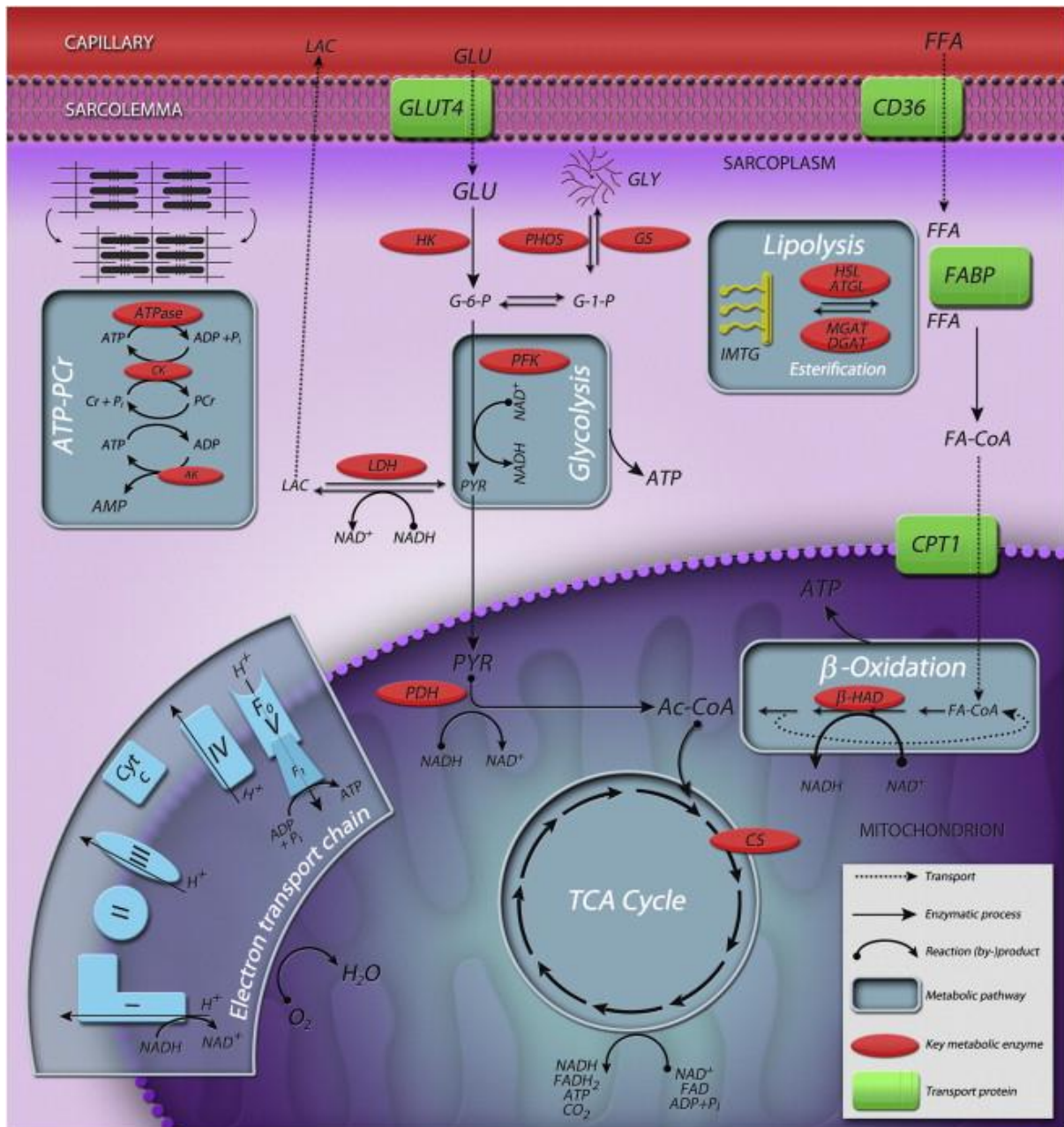


**Figure 22 : La chaîne respiratoire mitochondriale**  
Extraite de la thèse de B. Chatel

### 3.3.4. Synthèse et interactions des voies métaboliques

La synthèse des voies métaboliques musculaires pendant l'exercice est schématisée dans la Figure 23. Les filières énergétiques vont produire des quantités d'ATP très différentes. La filière aérobie possède le rendement le plus élevé. En effet, la dégradation d'une molécule de glucose permet la production nette de 38 ATP et de 39 ATP pour une molécule de G-6-P issue de la glycolyse. Concernant les lipides, le rendement net est de 129 ATP par molécule de palmitate oxydé, par exemple. La filière anaérobie alactique a un rendement net de seulement 2 ATP produits à partir d'une molécule de glucose. Si les 3 filières énergétiques ont été présentées ici de manière distincte, il est important d'avoir à l'esprit qu'en réalité ces 3 systèmes ne fonctionnent pas de manière isolée et indépendante. Pour tout type d'exercice, ces 3 systèmes interviennent simultanément mais dans des proportions différentes (pour revue, Egan & Zierath, 2013). A titre d'exemple, lorsque l'intensité de l'exercice est faible à modérée, les principales sources d'énergie qui alimentent les muscles squelettiques sont le glucose et les acides gras libérés par la lipolyse du tissu adipeux. De plus, l'utilisation des substrats à l'apport d'énergie pendant l'exercice est influencé par : i) des facteurs intrinsèques de l'exercice : l'intensité, la durée et le mode d'exercice, ii) des facteurs métaboliques : les schémas de recrutement musculaire, les capacités enzymatiques, les taux de délivrance des différents substrats, et iii) des facteurs externes : les conditions environnementales, l'état nutritionnel, l'âge et la composition corporelle (pour revue, Brooks, 1998 ; Spriet & Watt, 2003).





**Figure 23 : Synthèse des voies métaboliques musculaires**

Les voies métaboliques de production d'ATP dans le muscle squelettique comprennent 3 systèmes de production énergétique. Le premier est le système ATP-PCr dans lequel la dégradation de la PCr par l'enzyme *créatine kinase* (CK) produit de la créatine et P<sub>i</sub>, qui est transféré à l'ADP pour reformer l'ATP ; l'enzyme *adenylate kinase* (AK) ou MK catalyse la formation d'ATP et d'AMP à partir de 2 molécules d'ADP. La deuxième voie métabolique est la glycolyse anaérobie. Le glucose-6-phosphate (G-6-P), dérivé du glycogène musculaire (GLY) (catalysé par l'enzyme *phosphorylase*, PHOS) ou de la glycémie circulante (GLU) (catalysée par l'enzyme *hexokinase* (HK)), est catabolisé en pyruvate (PYR) puis réduit en lactate (LAC) par l'enzyme *lactate déshydrogénase* (LDH). La troisième voie métabolique est le système aérobie où le métabolisme des glucides (glycolyse) et des lipides (β-oxydation) produit de l'acétyl-CoA (Ac-CoA). Ce dernier entre dans le cycle de Krebs (TCA) situé dans les mitochondries. Les 2 principales voies métaboliques, c'est-à-dire la glycolyse anaérobie et la phosphorylation oxydative, sont liées par le complexe enzymatique *pyruvate déshydrogénase* (PDH). La protéine de transport du glucose, GLUT4, en facilite l'absorption du compartiment sanguin vers le compartiment sarcoplasmique. Le glucose peut ensuite entrer dans la glycolyse où il peut être stocké sous forme de glycogène grâce à l'enzyme *glycogène synthase* (GS). La protéine de transport FAT/CD36 facilite le transport des acides gras à longues chaînes carbonées (FFA) au niveau du sarcolemme et s'associe avec les protéines de liaison (FABP<sub>pm</sub>) et la palmitoyltransférase carnitine 1 (CPT1) afin de faciliter leur transport à travers la membrane mitochondriale. Les FFAs entrant dans le myocyte peuvent être acheminés (via la navette

CPT) dans la mitochondrie afin d'être oxydés par  $\beta$ -oxydation, ou alors être détournés pour le stockage intramusculaire sous forme de triglycérides (IMTGs), par estérification grâce aux enzymes *monoacylglycérol acyltransférase* (MGAT) et *diacylglycérol acyltransférase* (DGAT). La libération des FFAs depuis les IMTGs, lors de la lipolyse dans les muscles squelettiques pendant l'exercice, se produit par les *hormone-sensitive lipase* (HSL) et *adipose triglyceride lipase* (ATGL). Cyt c, cytochrome c oxidase ; PFK, enzyme *phosphofructokinase*. Extraite de Egan & Zierath, (2013).

## 4. Capacités de remodelages et d'adaptations du tissu musculaire

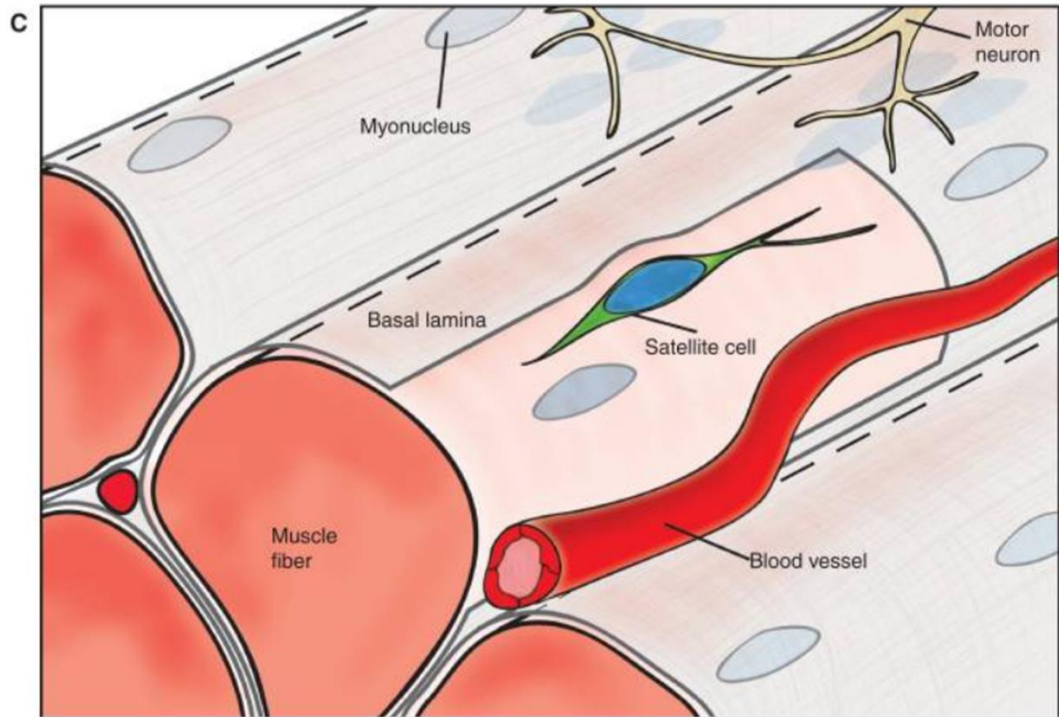
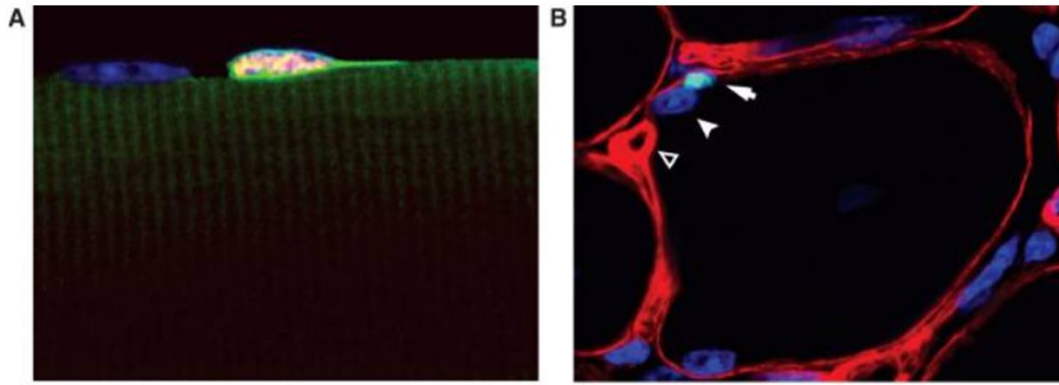
Le tissu musculaire strié squelettique est doté d'une importante plasticité en réponse à de nombreux stimuli comme, par exemple, l'activité physique (Staron et al. 1990 ; Hudlicka, 1977 ; Messonnier et al. 2001 ; Hoppeler & Fluck, 2003), l'inactivité physique (Ferrando et al. 1997 ; de Boer et al. 2007 ; Evans, 2010 ; Poulsen, 2012 ; Bodine, 2013 ; Campbell et al. 2013), et des processus physiopathologiques (Mateos-Aierdi et al. 2015 ; Ravelojaona et al. 2015 ; Barreiro & Jaitovich, 2018). Ces stimuli entraînent des changements phénotypiques musculaires induisant une hypertrophie ou une atrophie musculaire mais également des modifications métaboliques et microvasculaires (pour revue, Matsakas & Patel, 2009). La croissance des fibres musculaires dépend de la balance entre le taux de synthèse des protéines et leurs dégradations (Phillips, 2014). Une régulation à la hausse de cette balance induit une hypertrophie des fibres musculaires. Le développement de ces fibres est aussi possible par l'apport nucléaire dû à l'activation des cellules satellites, véritables cellules souches du muscle.

Le rôle essentiel des cellules satellites dans la croissance des fibres musculaires et la régénération de ces dernières sera en premier lieu abordé. Puis, les adaptations du tissu musculaire en réponse à un entraînement, et plus particulièrement à un entraînement en endurance (entraînement réalisé par les patients drépanocytaires dans le cadre de ce travail doctoral) au niveau microvasculaire, structural et métabolique seront ensuite développées.

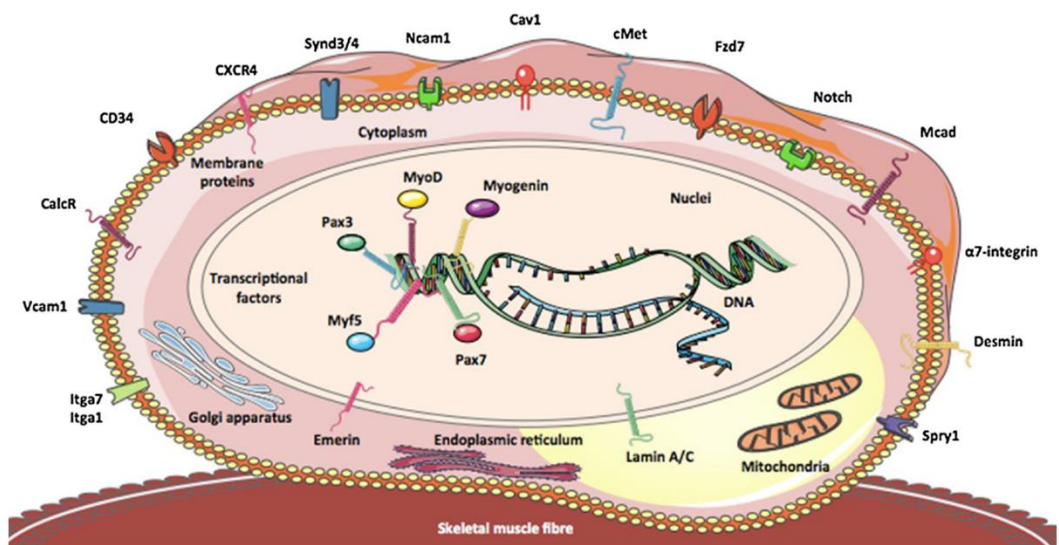
### 4.1. Le potentiel régénératif : rôle et étude des cellules satellites

Le muscle strié squelettique possède un important potentiel régénératif qui lui permet de faire face aux différents niveaux de sollicitation et à de possibles défaillances. Cette régénération myogénique est en partie possible grâce aux cellules satellites reconnues comme jouant un rôle essentiel dans la maintenance, la réparation et la croissance des fibres musculaires (Cossu & Biressi, 2005 ; Buckingham, 2006 ; Relaix & Marcelle, 2009). Découvertes par Alexander Mauro en 1961, les cellules satellites sont mononuclées et spécifiques par leur localisation entre le sarcolemme et la membrane basale des fibres musculaires (Mauro, 1961) (Figure 24, A-C). Elles représentent la source principale des nouveaux myonucléi dans les fibres musculaires squelettiques postnatales (Reznik, 1969 ;

Moss & Leblond, 1970). Dans le muscle de l'adulte sédentaire et sain, elles sont généralement dans un état quiescent et représentent 2 à 7% du nombre total de myonucléi (Watkins & Cullen, 1988 ; Maier & Bornemann, 1999 ; Charifi et al. 2003). Cependant, en réponse à divers stimuli (mécaniques, traumatiques, pathologiques...), ces cellules sont capables de sortir de leur quiescence. Elles génèrent des précurseurs, ou myoblastes, qui prolifèrent, se différencient ou retournent en quiescence. Ainsi, ces myoblastes peuvent : i) fusionner entre eux pour former une nouvelle myofibre, ii) fusionner avec une fibre musculaire pré-existante en faisant don de leur noyau à cette fibre ou, iii) revenir à l'état de repos en reconstituant le pool de cellules satellites résidentes. Ce mécanisme d'auto-renouvellement permet au pool de cellules satellites de rester relativement stable au cours de la vie dans le muscle adulte (Schmalbruch, 1976). La progression de la cellule satellite à travers le programme myogénique est orchestrée par des régulations à la hausse ou à la baisse du facteur de transcription Pax7 et des facteurs de régulation myogénique (MRFs) (Seale et al. 2000). L'expression de ces marqueurs spécifiques de l'état de la cellule satellite permet de distinguer les différentes étapes (Figure 25). La localisation de ces marqueurs au sein de la cellule satellite est présentée dans la Figure 24-D. A l'état de quiescence, la cellule satellite va exprimer des marqueurs cellulaires spécifiques comme le marqueur membranaire Ncam (ou CD56), la protéine cytoplasmique desmine et des facteurs de transcription tel que Pax7. Les marqueurs Pax7 et CD56 sont les 2 marqueurs les plus couramment utilisés dans la littérature. CD56 a également l'avantage de marquer, en plus de la membrane des cellules satellites, le cytoplasme des myocytes en cours de régénération. La première phase de l'engagement myogénique est marquée par l'expression de Myf5 suivie de l'expression de MyoD, qui permettent ainsi de repérer la majorité des cellules satellites nouvellement activées. Ki67 est également un marqueur ubiquitaire d'activation nucléaire couramment utilisé dans la littérature et permet aussi d'identifier les cellules satellites en prolifération. Après la prolifération, la différenciation terminale de la cellule satellite est initiée par une régulation à la hausse du facteur de régulation myogénique MRF4 et de la myogénine ainsi que par une régulation à la baisse de Pax7. En revanche, si l'expression de Pax7 demeure élevée après la prolifération, les cellules satellites n'entrent pas en différenciation terminale mais retournent à l'état de repos permettant de reconstituer le pool de cellules satellites résidentes (Snijders et al. 2015).



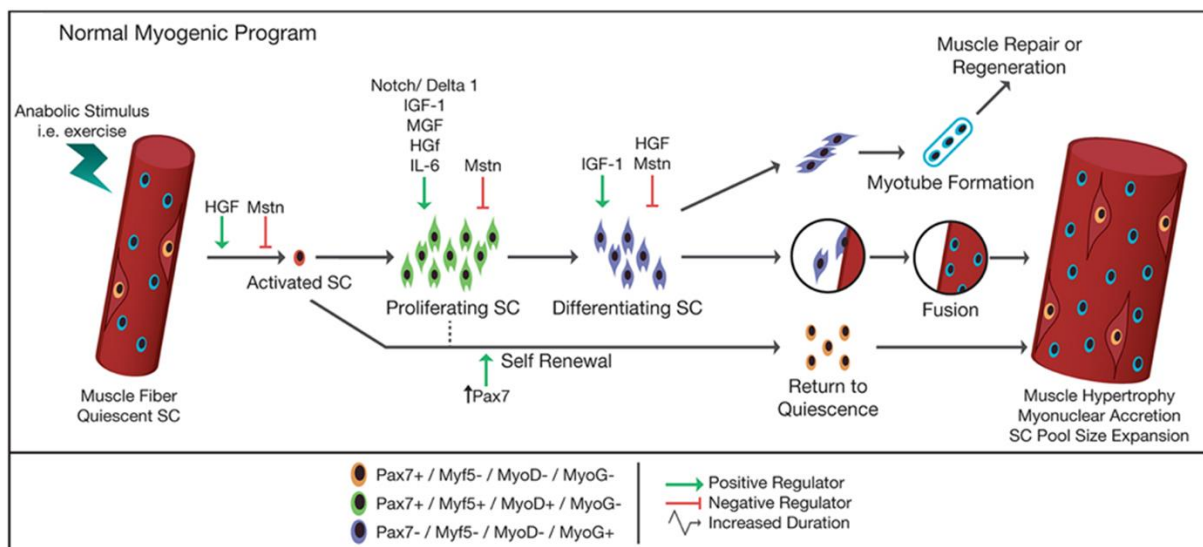
D





**Figure 24 : Localisation et marqueurs moléculaires de la cellule satellite.**

A : Les cellules satellites résident le long de la fibre musculaire différenciée et leur noyau est marqué par le Pax7 (rouge) ; noyaux (bleu) ; cytoplasme (vert). B : Les cellules satellites (flèche) marquées par le Pax7 (vert) se trouvent sous la lame basale (rouge) qui entoure chaque fibre musculaire. Dans le muscle mature, les cellules satellites sont associées à un myonucléi (pointe de flèche) et se trouvent généralement à proximité des capillaires (pointe de flèche vide). C : Représentation du muscle squelettique et de la localisation des cellules satellites. Extrait de Bentzinger et al. (2012). D : Marqueurs moléculaires intracellulaires et membranaires d'une cellule satellite en état de quiescence ou d'activation. Les cellules satellites peuvent être identifiées à l'aide de l'expression de certaines protéines intracellulaires spécifiques telles que le facteur de transcription Pax7, les protéines de la membrane nucléaire (lamin A/C et emerin) et des marqueurs situés sur la membrane cellulaire : syndecans 3 et 4 (Synd3/4), muscle M-cadhérine (Mcad), récepteur de calcitonine (CalcR), récepteur de chimiokine C-X-C de type 4 (CXCR4), calveolin-1 (Cav1),  $\alpha$ - et  $\beta$ -intégrins (Itga7 et Itb1), molécule d'adhésion cellulaire neuronale 1 (Ncam1), molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1 (Vcam1) et CD34. Extrait de Abreu, (2018).



**Figure 25 : Représentation schématique d'un programme myogénique en réponse à un stimulus anabolisant.**

Dans le muscle mature, les cellules satellites sont typiquement dans un état de repos et résident dans une niche entre le sarcolemme et la lame basale de leur fibre musculaire associée. Lors de la stimulation anabolisante (p.ex. exercice physique, musculation), les cellules satellites s'activent et commencent à proliférer. Après la prolifération, les cellules satellites se différencient. Puis elles fusionnent entre elles pour former de nouveaux myocytes ou alors elles fusionnent avec une fibre musculaire pré-existante en faisant don de leur noyau au myocyte en question, entraînant une hypertrophie de celui-ci. Une troisième issue est le retour à leur état de quiescence (auto-renouvellement) pour maintenir le pool. La progression de la cellule satellite à travers le programme myogénique est orchestrée par la régulation à la hausse ou à la baisse du facteur de transcription Pax7 et des facteurs régulateurs myogéniques (Myf5, MyoD, MRF4 et Myogenin). Un certain nombre d'autres facteurs [par exemple, le facteur de croissance hépatocytaire (HGF), la myostatine (Mstn), Notch/Delta1, l'interleukine-6 (IL-6), le facteur de croissance mécanique (MGF) et le facteur de croissance semblable à l'insuline (IGF-1)] ont également été identifiés comme ayant une influence positive ou négative sur les différents stades du programme myogénique. Extrait et modifié de Snijders et al. (2015).

**4.2. Adaptations du tissu musculaire en réponse à un entraînement aérobie**

En réponse à un exercice physique, les adaptations du tissu musculaire sont variables. Elles dépendent notamment du mode (aérobie vs résistance), de la fréquence, de la durée et de l'intensité de l'exercice. L'entraînement en endurance est généralement réalisé à des

intensités faibles à moyennes, correspondant à 40-60% de la consommation maximale d'oxygène ( $VO_{2max}$ ). Cette partie va être consacrée aux adaptations musculaires, microvasculaires et métaboliques en réponse à ce type d'entraînement. Les différentes adaptations sont résumées dans le Tableau 3.

#### 4.2.1. Adaptations musculaires

A l'inverse de l'entraînement en résistance, l'entraînement en endurance n'engendre que de faibles variations de la masse musculaire. Ce mode d'entraînement n'entraîne généralement pas de modification de la typologie des fibres musculaires, excepté lorsqu'il est pratiqué sur de longues durées. Sur la base de données histologiques, de nombreuses études rapportent une augmentation significative de la surface de section des fibres musculaires de sujets sains (Messonnier et al. 2001 ; Charifi et al. 2003 ; Charifi et al. 2004) ou pathologiques (Bankole et al. 2016 ; Maltais et al. 1996) en réponse à un entraînement en endurance. Aussi, cette surface de section est augmentée chez des sujets ou athlètes entraînés en endurance par rapport à des sujets sédentaires de même âge (Harber & Trappe, 2008). Cette adaptation est généralement spécifique aux fibres de type I, principalement recrutées lors d'un tel entraînement (endurance). Cette hypertrophie peut notamment résulter de l'activation du potentiel régénératif musculaire. La prolifération des cellules satellites en réponse à un entraînement peut, en effet, entraîner une accréation de myonuclei permettant le développement de la fibre musculaire (Charifi et al. 2003 ; Kadi et al. 2005 ; Mackey et al. 2007). Si dans la littérature il est bien établi que l'entraînement en résistance et plus particulièrement les exercices excentriques entraînent une hypertrophie par l'activation et la prolifération rapide des cellules satellites (pour revue, Murach et al. 2018), le rôle des cellules satellites en réponse à un entraînement en endurance, demeure cependant incertain (pour revue, Abreu et al. 2017). Une relation claire entre l'expansion des cellules satellites dans les fibres exprimant MHCI et la performance aérobie a été mise en évidence, indépendamment de l'accréation myonucléaire ou de la croissance musculaire. Cependant, le déclencheur de ce processus d'activation n'est pas encore tout à fait compris et il semblerait que ce soit un processus multifactoriel bien orchestré (pour revue, Abreu et al. 2017).

#### 4.2.2. Adaptations microvasculaires

De nombreuses études ont montré que l'entraînement en endurance s'accompagne d'une augmentation de la densité capillaire, que ce soit chez le sujet sain ou pathologique. Cette augmentation est généralement spécifique aux fibres exprimant MHC I et MHCIIA (Andersen & Henriksson, 1977 ; Brodal et al. 1977 ; Coggan et al. 1992 ; Messonnier et al. 2001 ; Charifi

et al. 2004 ; Gavin et al. 2007 ; Cocks et al. 2013 ; Gouzi et al. 2013 ; Baum et al. 2015 ; Cocks et al. 2015 ; Lewis et al. 2015). Il est intéressant de constater, selon les travaux de Vincent et al. (2012), que la densité capillaire est plus élevée chez les porteurs du trait drépanocytaires actifs que chez les plus sédentaires. Cette capillarisation plus importante permet d'augmenter la surface d'échange et de réduire la distance de diffusion des échanges gazeux entre les compartiments sanguins et musculaires, mais cela est aussi valable pour les transferts de chaleur, de métabolites et de nutriments. En améliorant l'approvisionnement et la capacité de diffusion de l'oxygène des capillaires à la mitochondrie, cette capillarisation majorée permet de maintenir un environnement favorable à la production d'énergie nécessaire aux contractions musculaires répétées. Il semblerait, selon Brown & Hudlicka (2003), que cette angiogenèse induite par l'entraînement en endurance soit plutôt le résultat d'une angiogenèse par division capillaire, plutôt que par bourgeonnement, et qu'elle serait initiée par l'augmentation du flux sanguin musculaire et des forces hémodynamiques associées. Cette observation correspondrait au fait que l'angiogenèse concerne les fibres musculaires recrutées pendant l'exercice et recevant le flux sanguin (pour revue, Brown & Hudlicka, 2003). En plus de cette augmentation du nombre de capillaires, la tortuosité des microvaisseaux augmente en réponse à l'entraînement, comme l'avait montré une étude chez des sujets âgés (Charifi et al. 2004). Cette double adaptation de la croissance capillaire et de sa tortuosité contribue à améliorer quantitativement et qualitativement l'approvisionnement du muscle en oxygène et en substrats.

#### 4.2.3. Adaptations métaboliques

De façon générale, l'entraînement en endurance induit rapidement une augmentation de la densité mitochondriale dans les régions sous-sarcolemmales et inter-myofibrillaires des fibres musculaires (Hoppeler, 1986). Cette densité plus élevée s'accompagne d'une augmentation de la taille du réseau mitochondrial et de son efficacité. Ces adaptations mitochondriales contribuent à améliorer l'aptitude aérobie du muscle et la capacité des fibres musculaires à produire de l'ATP. En effet, l'augmentation de l'activité d'enzymes clés du métabolisme oxydatif (de la  $\beta$ -oxydation, du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire) a fréquemment été rapportée à la suite d'un entraînement en endurance chez des sujets sains (Messonnier et al. 2001 ; Burgomaster et al. 2006 ; Gibala et al. 2006 ; Hood et al. 2011) ou pathologiques (Maltais et al. 1996 ; Bankole et al. 2016). Ces adaptations du métabolisme aérobie induites par l'entraînement en endurance ont aussi une conséquence métabolique importante : l'épargne du glycogène. En effet, l'entraînement en endurance induit une augmentation de la part des lipides et une diminution de la part des hydrates de carbone dans la fourniture énergétique lors d'un exercice d'une intensité absolue et relative donnée, ce qui

conduit à une épargne du glycogène musculaire (Brooks & Mercier 1994). En parallèle d'une mise en jeu préférentielle des mécanismes oxydatifs, l'entraînement en endurance diminue la lactatémie, que ce soit pour un exercice d'intensité absolue ou relative donnée. Pour un exercice d'intensité absolue donnée, l'entraînement en endurance diminue essentiellement la production de lactate (Bergman et al. 1999 ; Miller et al. 2002). Pour un exercice d'intensité relative donnée (puissance absolue supérieure après entraînement en endurance), l'entraînement en endurance diminue les concentrations essentiellement par une augmentation des processus de recyclage du lactate (Bergman et al. 1999 ; Messonnier et al. 2013) par oxydation (Bergman et al. 1999 ; Emhoff et al. 2013). En effet, une partie importante du lactate produit pendant l'exercice peut aussi être recyclé et utilisé comme substrat énergétique. Dans ce cas, le lactate est d'abord oxydé en pyruvate par la LDH (essentiellement de forme H : H-LDH), le pyruvate entrant à son tour dans le métabolisme oxydatif. Le « cross-talk » entre les fibres I et II mais aussi entre les différents tissus ou organes (muscle, foie, cerveau, reins, cœur) est certainement un élément majeur de cette adaptation (Brooks, 1985 ; Brooks, 2002 ; Gladden, 2007 ; Brooks, 2018). Les puissances aux seuils lactiques 1 et 2, qui marquent des points d'inflexion dans la courbe d'évolution de la lactatémie, en fonction de l'intensité de l'exercice lors d'un exercice incrémental (Davis et al. 1983), se trouvent à des intensités absolues et relatives plus élevées. Cela permet la réalisation d'un effort d'une puissance absolue et relative plus importante avant que le lactate sanguin ne s'élève au-delà de valeurs critiques que l'on peut caractériser par l'incapacité à maintenir une valeur de lactatémie stable (Heck et al. 1985 ; Beneke et al. 1995). En réponse à un entraînement en endurance, une augmentation du contenu musculaire en protéines impliquées dans l'approvisionnement énergétique du glucose (GLUT4) et en protéines impliquées dans l'homéostasie du pH intramusculaire est observée (Juel, 2006). Ainsi, les répercussions sur l'homéostasie musculaire, pour un exercice de même intensité absolue et même relative, sont plus modestes après un entraînement.

Ces différentes adaptations qui facilitent l'approvisionnement et l'utilisation de l'oxygène pour la production d'énergie au sein du muscle, améliorent la capacité à réaliser un exercice prolongé, la performance sportive mais aussi l'aisance dans les activités de la vie quotidienne, sans fatigue excessive (Davis et al. 1979 ; Messonnier et al. 1997 ; Chuang et al. 2001 ; Messonnier et al. 2013).



**Tableau 3 : Synthèse des adaptations du tissu musculaire et de l'aptitude physique après un entraînement en endurance.**

<b>Adaptations</b>	
<i>Hypertrophie musculaire</i>	↔
<i>Force et puissance musculaires</i>	↔ ↓
<i>Surface des fibres musculaires</i>	↔ ↑
<i>Adaptations neuronales</i>	↔ ↑
<i>Capacité anaérobie</i>	↑
<i>Synthèse des protéines des myofibrilles</i>	↔ ↑
<i>Synthèse des protéines mitochondriales</i>	↑ ↑
<i>Tolérance au lactate</i>	↑ ↑
<i>Capillarisation</i>	↑ ↑
<i>Densité mitochondriale et fonction oxydative</i>	↑ ↑ ↑
<i>Capacité d'endurance</i>	↑ ↑ ↑

L'entraînement en endurance comprend généralement des exercices d'une durée de plusieurs minutes à plusieurs heures, à intensité d'exercice de faible à modérée (sous maximale), incorporant des exercices répétitifs à faible résistance comme le cyclisme, la course à pied et la natation. ↑, les valeurs augmentent ; ↓, les valeurs diminuent ; ↑ ou ↓, légère adaptation ; ↑ ↑, changement modéré ; ↑ ↑ ↑, changement important ; ↔ ↑ ou ↔ ↓, aucun ou léger changement. Extrait et adapté de Egan & Zierath, (2013).

# CHAPITRE 3

## REPERCUSSIONS MUSCULAIRES ET FONCTIONNELLES DE LA DREPANOCYTOSE.

### QUE FAUT-IL ATTENDRE D'UNE ACTIVITE PHYSIQUE ADAPTEE ?

*Ce chapitre se compose d'une revue de littérature.*

*Cette revue fait un état des lieux de la littérature concernant l'impact de la drépanocytose sur le muscle squelettique, de la cellule à la fonction, des études sur les modèles murins aux études humaines. L'impact de ces répercussions musculaires et fonctionnelles est ensuite discuté et mis en lien avec les activités de la vie quotidienne de ces patients.*

*Cette revue souligne également les potentiels effets bénéfiques d'une activité physique régulière et d'intensité modérée sur la fonction musculaire et plus globalement sur le bien-être des patients drépanocytaires.*

---

#### **REVUE ASSOCIÉE :**

**Merlet AN\***, Chatel B\*, Hourdé C, Ravelojaona M, Bendahan D, Féasson L, Messonnier LA.

How Sickle Cell Disease Impairs Skeletal Muscle Function: Implications in Daily Life.

**Med Sci Sports Exerc.** 2018. doi: 10.1249/MSS.0000000000001757.

---

La littérature relative aux répercussions musculaires de la drépanocytose est relativement pauvre, sans doute est-ce lié au fait que cette atteinte est moins vitale pour le patient que celles d'autres organes. Néanmoins, les crises vaso-occlusives peuvent également se dérouler au sein du tissu musculaire, pouvant conduire à une myonécrose du tissu, bien que cette complication demeure relativement rare ou en tout cas peu décrite (Mani & Duffy, 1993 ; Malekgoudarzi & Feffer, 1999). Quoi qu'il en soit, l'analyse de biopsies musculaires de patients drépanocytaires, à l'écart de toutes crises vaso-occlusives, ne rapporte pas de nécrose cellulaire ni de marqueur important de lésion tissulaire (Ravelojaona et al. 2015). Cependant, ces travaux ont pour la première fois mis en évidence un profond remodelage de ce tissu, que ce soit au niveau microvasculaire, structural ou énergétique.

L'analyse du réseau microvasculaire a mis en évidence une raréfaction des microvaisseaux pouvant accentuer la réduction d'apport de l'oxygénation au niveau musculaire, comme cela a également été suggéré par des études centrées sur l'oxygénation microvasculaire (Waltz et al. 2012b ; Charlot et al. 2015). L'étude de Ravelojaona et al. (2015) rapporte également un remodelage de la morphométrie des microvaisseaux avec un élargissement de leur calibre et une diminution de leur tortuosité. Si ce remodelage tend à faciliter le passage des globules rouges falciformes dans la microcirculation (Ravelojaona et al. 2015), il peut également être associé i) à une augmentation du débit cardiaque et du débit sanguin local (Pianosi et al. 1991 ; Belhassen et al. 2001) et/ou ii) au dysfonctionnement endothélial et aux altérations vasculaires rapportées dans la drépanocytose (Gladwin & Vichinsky, 2008). Les patients drépanocytaires présentent aussi une hypotrophie musculaire (Barden et al. 2002 ; Dougherty et al. 2011) et l'étude morphohistologique des fibres musculaires a également retrouvé une réduction significative de leur trophicité (Ravelojaona et al. 2015) par rapport à des sujets contrôles sains. Ces résultats pourraient en partie s'expliquer par le style de vie sédentaire, le mauvais état nutritionnel, la composition corporelle et le retard de croissance de ces patients (Barden et al. 2002 ; Dougherty et al. 2011 ; Ravelojaona et al. 2015). L'étude énergétique du tissu musculaire a mis en évidence une altération de la capacité oxydative musculaire chez ces patients. Il existe une diminution simultanée des activités enzymatiques du cycle de Krebs, le la  $\beta$ -oxydation et de la chaîne respiratoire mitochondriale (CS,  $\beta$ -HAD et COx musculaires). Ce dysfonctionnement métabolique conduit à une contribution plus précoce et plus importante du système glycolytique par rapport au système oxydatif, entraînant ainsi une augmentation de la lactatémie et une acidose plus précoce lors d'un exercice même modéré (Freund et al. 1992 ; Moheed et al. 2007 ; Balayssac-Siransy et al. 2011 ; Chatel et al. 2017b ; Gellen et al. 2018 ; Messonnier et al. *in progress*). Ces différentes altérations peuvent donc contribuer à l'intolérance à l'effort et à la plus faible aptitude physique observées chez ces patients (Ravelojaona et al. 2015 ; Connes et al. 2011 ; Millis et al. 1994).

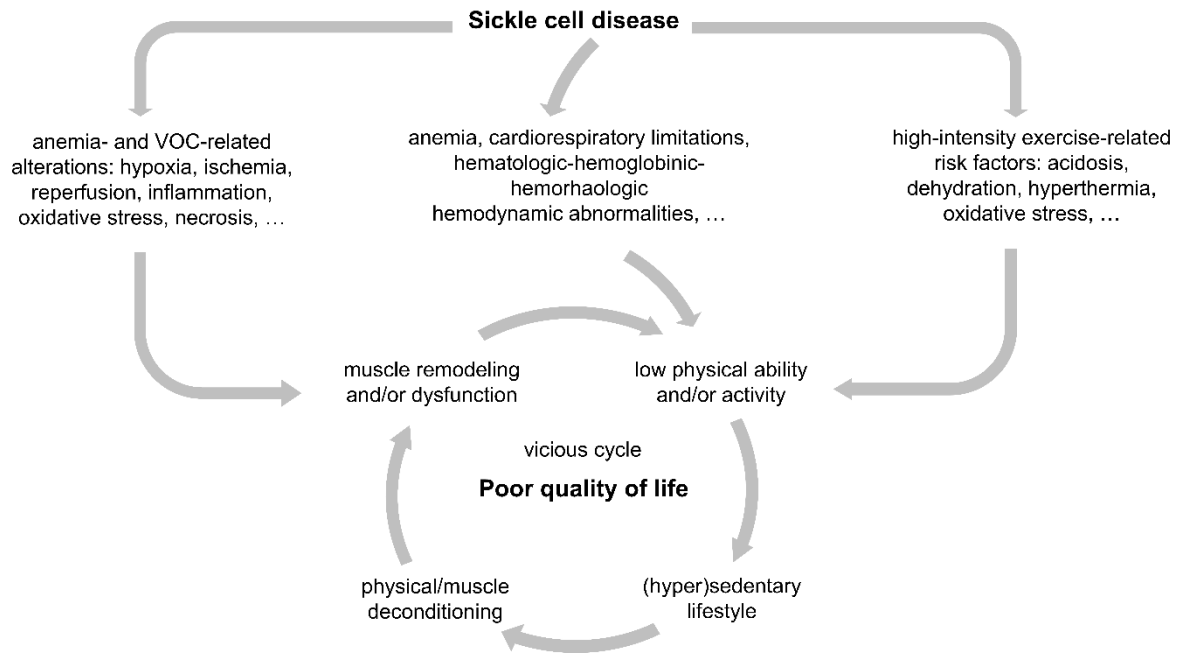
La littérature rapporte également une altération des capacités musculaires fonctionnelles associées à la drépanocytose. Plusieurs études portant sur des modèles murins ou chez des patients, montrent une diminution de la force et une fatigabilité musculaire accrue (Moheeb et al. 2007 ; Kohli et al. 2010 ; Dougherty et al. 2011 ; Waltz et al. 2012b ; Ohara et al. 2014 ; Capers et al. 2015 ; Chatel et al. 2017a). Cependant, cette fatigabilité musculaire n'est démontrée dans le modèle animal qu'à l'issue d'un exercice intense (Chatel et al. 2017a). La synthèse des répercussions musculaires de la drépanocytose est représentée dans le Tableau 4.

**Tableau 4 : Synthèse des répercussions de la drépanocytose au niveau du tissu musculaire et de sa fonction.**

Répercussions musculaires tissulaires et fonctionnelles	Patient drépanocytaire vs sujet sain
<b>Au niveau tissulaire</b>	
<b>Au niveau structural</b>	
<sup>a</sup> Surface pour 100 fibres, mm <sup>2</sup>	↓ ↓
<sup>a</sup> Fibres I, %	↑ ↑
<b>Au niveau microvasculaire</b>	
<sup>a</sup> Densité capillaire, cap.mm <sup>2</sup>	↓ ↓ ↓
<sup>a</sup> Surface des capillaires, μm <sup>2</sup>	↑ ↑
<sup>a</sup> Tortuosité des capillaires, U.A.	↓ ↓ ↓
<sup>a</sup> Diamètre des capillaires, μm	↑ ↑ ↑
<sup>a</sup> Nombre de capillaires par fibre	↓ ↓ ↓
<sup>a</sup> LC/PF, %	↔
<b>Au niveau énergétique</b>	
<sup>a</sup> Activité des enzymes glycolytiques, μmol.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup>	↔
<sup>a</sup> Activité des enzymes oxydatives, μmol.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup>	↓ ↓ ↓
<b>Au niveau fonctionnel</b>	
<sup>b</sup> Force musculaire, kg	↓ ↓
<sup>b</sup> Puissance pic, watt	↓ ↓ ↓
<sup>c</sup> Index de fatigue à l'exercice d'intensité modérée, %	↔
<sup>c</sup> Index de fatigue à l'exercice d'intensité intense, %	↓ ↓

↑, les valeurs augmentent ; ↓, les valeurs diminuent ; ↑ ou ↓, légère adaptation ; ↑ ↑ ou ↓ ↓, changement modéré ; ↑ ↑ ↑ ou ↓ ↓ ↓, changement important. <sup>a</sup>données extraites de l'étude de Ravelojaona et al. (2015) ; <sup>b</sup> données extraites de l'étude de Dougherty et al. (2011) ; <sup>c</sup> données extraites de l'étude de Chatel et al. (2017).

Compte tenu de la contre-indication à l'exercice intense et/ou prolongé chez ces patients en raison des risques associés (acidose, déshydratation, stress oxydatif etc.) (pour revue, Martin et al. 2018 ; Chirico et al. 2016), les patients adoptent, par précaution, un profil ultra-sédentaire excluant tous types d'efforts, même modérés, ce qui accentue d'autant leur déconditionnement physique et musculaire. Ces patients, entraînés dans un cercle vicieux, éprouvent alors des difficultés à faire face aux tâches les plus simples de la vie quotidienne (Figure 26).



**Figure 26 : Le cercle vicieux des répercussions de la drépanocytose.**

Les bénéfices d'une activité physique régulière sur le tissu musculaire et par extension sur la qualité de vie, sont bien connus dans de nombreuses pathologies chroniques. Le recours à cette stratégie thérapeutique dans la drépanocytose peut néanmoins paraître difficile au premier abord en raison des risques redoutés par les patients, leur entourage et les soignants. Cependant, quelques études ont rapporté la faisabilité et l'innocuité d'un exercice prudemment conduit à intensité modérée chez des patients drépanocytaires (pour revue, Martin et al. 2018 ; Liem et al. 2017).

Dans ce contexte, un programme d'entraînement en endurance réalisé à une intensité modérée très contrôlée pourrait être une stratégie intéressante compte tenu des potentiels effets bénéfiques sur la fonction musculaire et sur le bien-être des patients drépanocytaires.

# How Sickle Cell Disease Impairs Skeletal Muscle Function: Implications in Daily Life

AQ1 ANGÈLE N. MERLET<sup>1</sup>, BENJAMIN CHATEL<sup>2,3</sup>, CHRISTOPHE HOURDÉ<sup>2</sup>, MARION RAVELOJAONA<sup>1,4</sup>, DAVID BENDAHAN<sup>3</sup>, LÉONARD FÉASSON<sup>1,2,3,4</sup>, and LAURENT A. MESSONNIER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Inter-university Laboratory of Human Movement Sciences, University of Lyon, UJM Saint-Etienne, Saint-Etienne, FRANCE; <sup>2</sup>Inter-university Laboratory of Human Movement Sciences, University of Savoie Mont Blanc, Chambéry, FRANCE; <sup>3</sup>Aix-Marseille University, Marseille, FRANCE; and <sup>4</sup>Myology Unit, Department of Clinical and Exercise Physiology, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, FRANCE

## ABSTRACT

MERLET, A. N., B. CHATEL, C. HOURDÉ, M. RAVELOJAONA, D. BENDAHAN, L. FÉASSON, and L. A. MESSONNIER. How Sickle Cell Disease Impairs Skeletal Muscle Function: Implications in Daily Life. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Vol. 51, No. 1, pp. 00–00, 2019. Sickle cell disease (SCD) is the most frequent life-threatening genetic hemoglobinopathy in the world and occurs due to the synthesis of abnormal hemoglobin S (HbS). hemoglobin S-containing red blood cells (RBC) are fragile, leading to hemolysis and anemia, and adhere to the endothelium, leading to hemorheological and hemodynamical disturbances. In its deoxygenated form, HbS may polymerize, leading to sickling of red blood cells and potentially to vasoocclusive crises. Recent findings observed that SCD patients demonstrate significant skeletal muscle remodeling and display reduced muscle functional capacities, contributing to exercise intolerance and poor quality of life. Although acute high-intensity exercise is not recommended for SCD patients because it may increase the risk of sickling, regular moderate-intensity physical activity could have beneficial effects on skeletal muscle and more generally on the well-being of SCD patients. This article reviews the literature regarding the impact of the disease on muscular tissue characteristics and function, as well as the corresponding implications for SCD patients' quality of life. **Key Words:** SICKLE CELL ANEMIA, EXERCISE THERAPY, PHYSICAL ACTIVITY, HEMATOLOGY

## PATHOPHYSIOLOGY OF SICKLE CELL DISEASE

Sickle cell disease (SCD), the most frequent monogenic disorder in the world (1), is due to the synthesis of abnormal hemoglobin S (HbS), which tends to polymerize in its deoxygenated state (1). Polymerization of HbS rigidifies the red blood cells (RBC) (2), potentially leading to the disruption of RBC architecture and giving them a characteristic sickle shape (1). Sickle cell disease also induces endothelial inflammation, oxidative stress, and vascular adhesion, all three significantly altering blood hemorheological and hemodynamical properties (2). Collectively, all the above-mentioned “pathophysiological” consequences of SCD

favor sequestration of erythrocytes in the microcirculation, which may progress to potentially critical vasoocclusive crises (VOC). Vasoocclusive crises constitute the first major clinical manifestation of the disease (1). The repeated VOC-related ischemic insults and the subsequent reperfusion have been recognized in SCD as responsible for tissue remodeling and organ dysfunction (3). Thus, ischemia and reperfusion could directly contribute to morbidity and mortality in SCD (4).

A second major symptom of the disease is a chronic hemolytic anemia (1), which is often associated with endothelial dysfunction and vasculopathic complications (5). Sickling RBC break easily, leading to massive hemolysis (1), which is not counterbalanced by erythropoiesis. This leads to very low hemoglobin concentration and hematocrit (typically 6–8 g·dL<sup>-1</sup> and 25%–30%, respectively) (1). In addition, SCD patients also display arterial desaturation (6) and higher P<sub>50</sub> (the oxygen pressure at which hemoglobin is half saturated) (7). Collectively, low hemoglobin concentration and hematocrit, arterial desaturation, and low P<sub>50</sub> induce hypoxemia that may contribute to impair oxygen delivery to tissues (this point will be further discussed later in this review).

The present review will consider SCD patients, particularly sickle cell anemia patients (homozygous, HbSS), who classically display 85% to 95% HbS (1), and also HbSC

---

Address for correspondence: Laurent A. Messonnier, Ph.D., Université Savoie Mont Blanc, Campus Universitaire Savoie Technolac, F-73376 Le Bourget du Lac Cedex, France; E-mail: laurent.messonnier@univ-smb.fr.

A. N. M., B. C., L. F., and L. A. M. contributed equally to this study.

Submitted for publication March 2018.

Accepted for publication July 2018.

0195-9131/19/5101-0000/0

MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE®

Copyright © 2018 by the American College of Sports Medicine

DOI: 10.1249/MSS.0000000000001757



patients (heterozygous for HbS and HbC) with RBC containing approximately 50% HbS and 50% HbC (8). Informative insights obtained from murine models of SCD will also be reported. When appropriate, data from sickle cell trait (SCT) carriers (heterozygous, HbAS), who typically exhibit 35% to 45% HbS (1) will be provided for comparison or as complementary information.

## **SKELETAL MUSCLE CHARACTERISTICS IN SCD**

**Muscle complications and their signs.** The literature on muscle complications related to SCD is sparse but the rare studies demonstrated that skeletal muscle may suffer from SCD. Vasoocclusive crises in skeletal muscle have been documented in patients (9) and suspected in SCD mice (10). In patients, VOC have been shown to lead to muscle atrophy, contractures, fibrosis, and myonecrosis (9,11). Myonecrosis in SCD is usually illustrated by symmetric proximal muscle swelling, severe pain, warmth, and increased serum creatine kinase levels (12,13). Although myonecrosis has been described during or subsequent to VOC, signs of severe myonecrosis seem to disappear at distance from VOC. Indeed, Ravelojaona et al. (14) did not observe any important markers of tissue damage or necrosis in skeletal muscle of stable SCD patients.

Although myonecrosis is a relatively rare complication, both ischemia-reperfusion episodes related to VOC and hypoxemia related to anemia are known to induce major microvascular, structural, and energetics remodeling in skeletal muscle (4,6). This remodeling takes place in SCD patients, and to a lesser extent in SCT carriers (14–16).

**Muscle microvascular remodeling.** Sickle cell disease patients display microvessel rarefaction, that is, a lower capillary density (number of capillaries per mm<sup>2</sup>) and fewer capillaries in contact with muscle fibers (14) compared with control subjects. As previously suggested, this relative scarcity of microvessels in SCD could be a consequence of VOC in the smallest capillaries leading to their subsequent disappearance (14). Lower capillary tortuosity has also been observed in SCD patients (14). Low tortuosity may reduce the risk of RBC entrapment in the microvasculature by reducing the contact area between myocytes and adjacent capillaries although it is detrimental for gas and metabolite exchange.

Interestingly, SCD patients (14) display striking lumen enlargement within microvessels. This structural widening of the capillaries cannot only be explained by the disappearance of the smallest microvessels given that this remodeling process involves an overall enlargement of the microvasculature (14). However, the observed lumen enlargement in SCD patients does not seem to be accompanied by reinforcement of the capillary wall, suggesting a relative fragility of skeletal muscle microvasculature (14). Nevertheless, the enlargement of microvessels may facilitate the passage of less deformable HbS-containing erythrocytes through the capillary network, thereby contributing to alleviate but not eliminate the risk of jamming

in the microvasculature. Whether structural enlargement of the capillaries is an adaptive response to (i) the higher cardiac output and local blood flow of SCD patients (e.g., 17,18), (ii) the SCD-related hemorheological and hemodynamical disturbances and associated endothelial dysfunction (5), or (iii) a combination thereof remains to be investigated.

From a functional point of view, the reduced capillary density may, in addition to the already-mentioned degraded oxygen transport capacity (due to low hemoglobin concentration, arterial desaturation, and low P<sub>50</sub>), partly account for an impaired oxygen supply to skeletal muscle in SCD patients. However, it is unknown whether the enlargement of microvessels counterbalances the lower tortuosity and capillary network density to allow maintenance of adequate blood flow. Given that direct measurement of blood flow and oxygen transport is difficult, indirect indexes can be used. Ravelojaona et al. (14) used the capillary density–capillary surface area index to estimate instantaneous blood volume in a muscle slice and reported no difference between SCD patients and HbAA control subjects, suggesting that muscle blood supply was not altered. However, they did not consider the hemoglobin level which is a critical parameter for the proper assessment of muscle oxygen supply capacity. In that sense, the capillary density–capillary surface area–hemoglobin concentration index may be more suitable to evaluate oxygen delivery capacity in skeletal muscle. Computed from the data in the literature (14), this index was lower in SCD patients compared with control subjects (1.57 ± 0.39 vs 2.16 ± 0.45; *P* < 0.01). This clearly suggests lower muscle oxygen delivery capacity in patients. Of note, arterial desaturation (19), which may further reduce oxygen delivery, is not accounted for in the calculation of the capillary density–capillary surface area–hemoglobin concentration index. To compensate for the impaired oxygen supply, cardiac output and local blood flow have been reported to be approximately 50% higher in SCD at both rest and during exercise (e.g., 17,18). It is impossible to assess local muscle blood flow from our approach so it is impossible to infer on the true oxygen delivery to tissues. However, the supposed impairment in oxygen delivery to tissues finds support from studies using near-infrared spectroscopy (NIRS). These studies report reduced resting muscle microvascular oxygenation in adult and young SCD patients compared with control counterparts (20,21). Similarly, Charlot et al. (21) observed lower-muscle microvascular oxygenation in HbSC children compared with control HbAA counterparts although this difference was not observed in adults (20). Near-infrared spectroscopy investigations in other tissues and particularly in the brain (22) have reported congruent results indicating lower microvascular oxygenation in SCD patients. However, the interpretation that a lower NIRS signal strictly reflects lower microvascular oxygenation is debatable for skeletal muscle (23). In skeletal muscle, NIRS detects the overlapping myoglobin and Hb signals and, as recently proposed, myoglobin might be the main contributor



of the NIRS signal (23). Following this line of reasoning, the lower NIRS signal observed in SCD patients and children (20,21) may also indicate lower myoglobin saturation, thereby suggesting possible muscle tissue hypoxia. Although no direct evidence of tissue hypoxia has been reported in skeletal muscle of either SCD patients or mice, this remains a possibility given that cerebral hypoxia has been described in the Townes model of SCD mice (24). Further studies are required to determine whether cellular hypoxia is present, at least at the skeletal muscle level. As a whole, the reduced muscle oxygenation observed in SCD patients could be mainly attributed to anemia and arterial desaturation, despite compensatory hemodynamic adjustments.

**Muscle structural characteristics.** Compared with healthy counterparts, SCD children display muscle atrophy (25,26). The more sedentary lifestyle, poor nutritional status, different body composition (leaner and lighter), and growth retardation (25–27) in SCD children may, at least partly, account for the observed muscle atrophy. In adult SCD patients, clear amyotrophy was also observed. The amyotrophy was directly demonstrated at the muscle level by assessing the surface area for 100 muscle fibers, which was drastically lower in SCD patients compared to SCT carriers and control HbAA subjects (14). In addition, an altered muscle fiber type distribution has been observed in SCD patients compared to SCT and control subjects. Specifically, the percentage of type I fibers was higher than type IIa fibers, thereby suggesting a disappearance of type IIa fibers, whereas the amount of type I fibers was unchanged (14). Although these results could be explained by the repeated ischemia-reperfusion episodes which are known to induce significant muscle structural remodeling (4), it has been suggested that the reduction in proportion of type IIa fibers could be at least partly explained by the low intensity of physical activities performed by patients (14,28). Indeed, low-intensity activities do not require type II fiber recruitment. As a whole, the amyotrophy and alteration of muscle fiber type distribution are very likely, at least to some extent, the result of the hypersedentary lifestyle of SCD patients. A study conducted in totally sedentary Townes mice supports this hypothesis. Indeed, it has been shown that SCD and control mice display similar muscle mass, muscle volume, and fiber type distribution in the gastrocnemius muscle (29), suggesting that the presence of HbS does not alter muscle mass, muscle volume, or fiber type distribution when physical activity level is discarded as contributing factor. However, further studies are necessary to confirm this interpretation given that the comparison between humans and mice is difficult (e.g., different muscle fiber type distribution and characteristics, quadruped vs biped walking posture, different impacts of the pathology on the species).

**Muscle energetic characteristics.** Alterations in muscle energetics have also been observed in SCD patients (14), and to a lesser extent in SCT carriers (16). Reduced maximal activities of key enzymes of fatty acid oxidation

( $\beta$ -hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase) and the Krebs cycle (citrate synthase) have been reported in SCD patients (14), along with decreased activity of cytochrome *c* oxidase, a key enzyme of the respiratory chain, in type IIa and IIx muscle fibers (14). Collectively, these reductions in enzyme activity clearly illustrate impaired muscle oxidative capacity. Impaired muscle oxidative capacity is expected to limit muscle oxygen consumption. Although this is not the case at rest (20) (oxygen consumption may even be elevated (30) at rest, possibly due to a higher resting energy expenditure (27)), oxygen consumption is clearly depressed during exercise at a given absolute work rate in SCD patients than in healthy controls (31). On the other hand, the reduced oxygen consumption during exercise is believed to promote the nonoxidative glycolytic pathway, eventually leading to lactate production. Accordingly, a recent study suggested that exercising skeletal muscle of SCD mice has a higher glycolytic contribution to total ATP production compared to control wild type littermates (32). This conclusion was supported by the lower citrate synthase/enolase activity ratio indicating an imbalance between oxidative and glycolytic potentials (32). Furthermore, SCD mice had greater phosphocreatine depletion during intense exercise which could result from impaired oxygen delivery to muscle (32) as previously observed in patients (20,21) and could eventually promote glycolytic energy production. These alterations observed in SCD mice have been associated with exacerbated intramuscular acidosis during both moderate- and high-intensity electrically induced exercises, which further support the idea of a larger glycolytic contribution to energy production (32). As suggested by Miller et al. (33), the low hemoglobin concentrations resulting from chronic anemia in SCD patients may also explain the higher contribution of nonoxidative glycolytic processes to energy production and therefore the higher lactate production during exercise. Although the precise reasons for this energetic remodeling are still unknown, the suspected tissue hypoxia (34) might, at least in part, be considered as contributing factor. Because a significant part of lactate produced during exercise is released into the bloodstream, SCD patients are expected to display higher exercise-related blood lactate concentrations compared to control subjects (35–37). This hypothesis has been verified in response to various types of exercise including graded cycle exercise to exhaustion (35), 20-min submaximal cycling exercise bouts (36) and 5-min treadmill running bout at 5 km·h<sup>-1</sup> (37). The higher blood lactate concentrations found in exercising SCD patients have been attributed to the above-mentioned larger glycolytic contribution to energy production and also possibly to reduced efficiency of lactate removal mechanisms (35–37). Less efficient lactate removal is in total agreement with lower muscle oxidative capacity insofar as oxidation represents a major lactate removal process during exercise in humans.

These structural and energetic particularities likely contribute to the lower physical abilities and exercise limitations commonly reported in SCD patients (38,39). In the same

AQ2



line, Charrin et al. (40) recently observed lower peak oxygen uptake and maximal aerobic speed in SCD mice compared to their control counterparts. Because physical ability in SCD is beyond the scope of this review, we refer the readers to well-documented recent reviews (39,41) for further information in that topic. On the other hand, because SCD seems to impact skeletal muscle structure and energetics, muscle function must be considered.

## SKELETAL MUSCLE FUNCTION

**Force production.** Some studies have reported impaired muscle strength in young or adult SCD patients (20,26,37,42) and in mice (32,43–45). Interestingly, it has also been shown that expiratory muscle force was reduced in SCD patients (42,46). Several causes have been put forth to explain this lower force production, including lower muscle mass (20), a more sedentary lifestyle (42), impaired neural recruitment (20), repeated VOC-related injuries and oxidative stress (42,46,47). Because muscle strength is closely correlated with muscle volume, muscle atrophy could be the most likely explanation for muscle strength impairment. However, on the basis of body composition measurements, Dougherty et al. (26) suggested that the impaired muscle strength could not be totally linked to reduced muscle volume. Very recently, Dougherty et al. (48) reiterated their previous suggestions by reporting that lower muscle function in SCD children persists even if muscle performance parameters are adjusted for lean body mass. Similarly, Capers et al. (44) reported reduced grip test performance in SCD mice compared to wild type counterparts with lean body mass being identical for both groups. They also underlined that muscle performance can be improved by diet intervention independent of changes in lean body mass (44). On that basis, they suggested that alterations of muscle properties could be involved in the reduced force production capacity in SCD mice. In agreement with this hypothesis, anesthetized SCD mice have been reported to display lower electrically-induced maximal tetanic and peak forces compared to their control counterparts, even when values are normalized to muscle mass or volume (32). Calcium-related mechanisms may potentially be implicated in muscle dysfunction of SCD mice (32). Indeed, force relaxation and potentiation are also impaired in SCD mice, suggesting a potential calcium-handling deficiency (32). A recent report suggested that calcium-related alterations, and more generally muscle dysfunction, may be partly mediated by the greater level of oxidative stress observed in SCD mice (49). In addition, it has been suggested that deep tissue hyperalgesia could also explain, at least partly, the lower grip test performance reported in SCD mice (43,45). Indeed, grip test performance has been shown to improve (but not totally restored) after analgesia in SCD mice (43,45).

**Fatigability.** Fatigue has recently been suspected to be a major symptom of SCD (50,51). To the best of our knowledge, only one study has focused on muscle fatigability in SCD patients (20). This study compared the reduction in

maximal voluntary force after six intermittent isometric contractions at 50% of maximal voluntary force. Surprisingly, SCD patients displayed normal exercise-induced muscle fatigability compared to control subjects, despite reduced microvascular oxygenation and hemorheological abnormalities (20). Considering the well-acknowledged relationship between fatigability and exercise intensity (52), the discrepancy between the above-mentioned results (20) and the patients' feeling (based on the answers to questionnaires) (50) might be explained by the low intensity of the task used by Waltz et al. (20) for a fatigue protocol. This hypothesis is supported by the fact that oxygen consumption was similar to controls despite reduced microvascular oxygenation and hemorheological abnormalities (20) and also by a study conducted in mice (32). Indeed, while force reduction during a moderate-intensity exercise was similar between SCD and control mice, SCD mice presented greater muscle fatigability in response to intense exercise (32). Altered muscle characteristics, and especially potential metabolic dysfunction (52), could explain, at least in part, the early onset of fatigue described in both SCD patients (50) and mice (32).

## PHYSICAL EXERCISE: A POTENTIAL RISK OR A POSSIBLE THERAPEUTIC STRATEGY?

It is well known that intense exercise induces blood rheological disorders, endothelial activation, oxidative stress, and  $H^+$  production [for review see references (41, 53)]. All these factors are recognized as sickling promoters as they increase the risk of VOC in SCD patients (54). For instance, large amounts of  $H^+$  are produced during intense exercise, and the subsequent blood acidosis lowers the hemoglobin oxygen saturation (Bohr effect) that promotes polymerization of HbS (55). Dehydration and hyperthermia occurring during intense exercise could also contribute to sickling of RBC and promotion of VOC (39). On that basis, clinicians are reluctant to recommend physical activity for patients with SCD (39). Along the same line, parents do not support their children with SCD being involved in physical activities. Although the literature does not support such an unwillingness as among the several studies in which children, young adult or adult patients performed incremental exercise to volitional exhaustion or the development of symptoms (31,56,57) none of them reported major adverse events, it remains clear that strenuous exercise constitutes one of the main triggering factors of VOC (58). At the present time, exercise in persons with SCD should be individually tailored (to be at a moderate intensity), controlled and preferably performed under the supervision of health professionals. This also applies to children despite their higher oxidative capacity compared to adults (59) that may reduce the potential risks related to blood acidosis. Even SCT carriers may be at risk during high-intensity exercise. Indeed, sickled RBC have been found after exercise in SCT carriers (54,60). Moreover, SCT carriers are also subjected to oxidative stress (61), inflammation, and hemorheological



disturbances (60,62) during high-intensity exercise. Previous studies have underlined that acidosis, dehydration, hypoxia, and hyperthermia may collectively lead, in rare occasions, to severe complications such as rhabdomyolysis (literally “dissolution of skeletal muscle”), and sudden death (63).

Although high-intensity exercise increases the risk of RBC sickling (58), moderate-intensity endurance exercise does not seem to be unsafe (41). A few studies showed the feasibility and safety of acute moderate-intensity exercise in SCD patients. Indeed, patients were able to complete submaximal incremental exercise bouts (stopped before volitional exhaustion or symptom appearance) or 20-min moderate-intensity endurance exercise bouts without any severe clinical complications (36,64,65). Additionally, Balayssac-Siransy et al. (28) and Hedreville et al. (65) showed that acute moderate-intensity exercise did not induce hematological or hemorheological alterations or further alter autonomic nervous system activity. Although oxidative stress and endothelial activation significantly increased in some patients, even during mild exercise (64), and both could potentially promote RBC sickling (61), Faës et al. (64) concluded that mild- to moderate-intensity exercise is not detrimental in SCD.

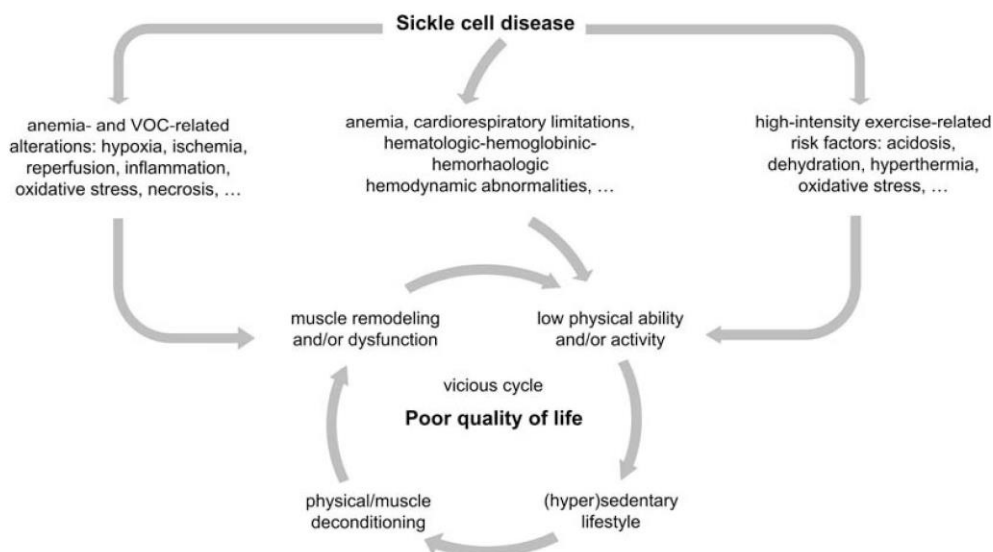
Particular interest is currently being paid to endurance training interventions in SCD. This is due to the fact that regular physical exercise, even of moderate intensity, induces health benefits in nonpathological subjects as well as in pathophysiological patients (e.g., chronic obstructive pulmonary disease, chronic heart failure). In healthy subjects, moderate-intensity chronic physical exercise increases the microvascular network, decreases lactate accumulation, and improves tissue oxygenation (66–68). In chronic obstructive pulmonary disease, regular exercise is known to improve physical fitness and also induce changes in muscle structure, muscle protein turnover regulation, mitochondrial enzyme activity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation (69). In SCD patients and mice, several protocols of exercise training/regular physical activity have been shown to be beneficial at the vascular level as well as on blood rheology, inflammation, endothelial activation, and oxidative stress [for reviews see refs (41, 53)]. At the muscular level, Tinti et al. (70) and Zanoni et al. (71) reported the positive effect of aquatic rehabilitation programs on muscle strength in SCD patients. Indeed, Zanoni et al. (71) observed that 12 wk of aquatic therapy is efficient to treat musculoskeletal dysfunctions and to increase muscle strength of trunk flexion, and hip extension and abduction. Recently, Camcıoğlu et al. (72) observed an improvement in respiratory muscle strength in a SCD patient following 12 wk of inspiratory muscle training. Additionally, one study showed active SCT carriers characterized by greater capillary density, increased oxidative capacities, and better performance during short and intense exercise bout than less active or sedentary counterparts (73). In accordance with these results, a very recent study conducted in the Townes model of SCD mice observed that 7 wk of endurance training was associated with (i) a significant reduction of

exercise-induced acidosis due to a lower contribution of nonoxidative glycolysis to total ATP production and (ii) improvements in muscle function (49). The authors concluded that regular physical activity could be beneficial given the potential involvement of muscle abnormalities in the pathophysiology of SCD (49). Recently, Liem et al. (74) showed for the first time the feasibility and safety of 12 wk of home exercise training (on stationary bikes) in children with SCD. No major adverse events occurred during the training period. However, the beneficial effects of the home exercise training intervention on the physical ability of the children were limited. Although an increase in mean peak oxygen consumption and peak cycling workload was observed after 7 wk of training, there was no significant improvement in hematologic and cardiopulmonary parameters after 12 wk of training. Although studies investigating exercise therapy in SCD seem to be very promising, further investigations (in larger cohorts and including control groups) are needed to find the most suitable training protocol to improve muscle function, physical ability, overall health, and quality of life of SCD patients and to be able to conclude definitely on the therapeutic interest of regular physical activity in SCD patients.

## CONSEQUENCES ON LIFESTYLE, DAILY LIFE, AND QUALITY OF LIFE

To summarize, the altered muscle function observed in SCD patients may collectively be the result of (i) anemia, (ii) VOC-related stresses (e.g., hypoxia, ischemia, reperfusion, inflammation, oxidative stress, and necrosis) and (iii) deleterious muscle microvascular, structural, and energetic remodeling (subjects of the present review). Muscle dysfunction is detrimental to physical ability (which is already affected by anemia, cardiorespiratory limitations, and hematological, hemoglobin, hemorheological, and hemodynamical abnormalities [see refs (39, 41) for review]). Along with physical fitness, daily life physical activities are also affected by muscle dysfunction. In accordance, several studies have reported lower physical activity energy expenditure in SCD patients compared to control HbAA subjects (27). Moreover, the risks associated with intense physical activity (e.g., acidosis, dehydration, hyperthermia, oxidative stress, and so on) may lead parents and/or clinicians to discourage children and adults with SCD from taking part in physical activities (75), contributing to the adoption of hypersedentary lifestyles by SCD patients. Hypersedentary behavior aggravates physical, and especially muscle, deconditioning so that SCD patients become trapped in a vicious cycle that leads to reduced muscle function, physical fitness, and mobility (Figure 1). F1

Once mobility is affected by low muscle strength and physical ability, patients have difficulties in home management and in the physical challenges of daily life. Accordingly, the first ventilatory (76), or so-called anaerobic (56,76), threshold which occurs at the transition from moderate- to high-intensity exercise is reached at very low exercise



**FIGURE 1**—The vicious cycle of repercussions of SCD on skeletal muscle, leading to a profound muscle remodeling and deconditioning, and consequently to a poor quality of life.

intensities, that is, on average 54 W (76) and at oxygen uptake of 0.4 to 0.8 L·min<sup>-1</sup> (56,77) (studied populations included both female and male patients). Considering the relationship between oxygen uptake and walking speed (78), walking may become a difficult task for SCD patients when the velocity is higher than 3.0 to 4.5 km·h<sup>-1</sup>. This inference illustrates how mobility can be limited in SCD patients. It can further be demonstrated that the physical capacity required to perform key activities of daily life are close to the patients' maximum, as has previously been shown in the elderly. For instance, in the context of SCD, Callahan et al. (56) reported very low mean peak oxygen uptake values at maximal effort of 0.95 L·min<sup>-1</sup> in women. In this case, walking at 4.5 km·h<sup>-1</sup> would constitute a near-maximal effort for these women. Moreover, a 5° positive slope, a headwind of 35 km·h<sup>-1</sup>, or extra load carriage of 10 kg (e.g., while shopping) would render walking at 4.5 km·h<sup>-1</sup> almost impossible for these patients (79,80). Similar inferences can be made from the study of Anthi et al. (77) which included both men and women.

In various disease and elderly populations, low levels of physical fitness and habitual activity are strong predictors of poor quality of life (81) and mortality (82). This is very likely also applicable in SCD patients who demonstrate greater fatigue associated with a lower quality of life (51). Impacts on mobility also lead to dependence, reductions in social interactions, and ultimately to depression. The

benefits of regular physical activity on muscle function, dependence and mood state are well known. In this context, moderate-intensity endurance training might constitute an interesting therapeutic strategy for patients. However, the validity of regular endurance exercise as medicine in SCD remains to be established.

## CONCLUSIONS

Because of its less vital nature and because it is relatively silent, skeletal muscle has been poorly studied in the context of SCD. Yet skeletal muscle is affected and the impact on muscle function, daily life and quality of life is major. In that sense, the benefits that moderate-intensity endurance training programs may induce in improving muscle function and quality of life must be considered in future studies.

The results of the studies referenced in this review are presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification, or inappropriate data manipulation. The results of the present study do not constitute endorsement by the American College of Sports Medicine.

This study was supported by a grant from the University Savoie Mont Blanc (DréPH\_AAP2017). The funder had no role in study, decision to publish, or preparation of the article.

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

## REFERENCES

AQ3

1. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle cell disease. *N Engl J Med.* 2017;376(16):1561–73.
2. Connes P, Verlhac S, Bernaudin F. Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anemia. *Br J Haematol.* 2013;161(4):484–98.
3. Osarogiagbon UR, Choong S, Belcher JD, Vercellotti GM, Paller MS, Hebbel RP. Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. *Blood.* 2000;96(1):314–20.
4. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011;17(11):1391–401.



5. Gladwin MT, Vichinsky E. Pulmonary complications of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2008;359(21):2254–65.
6. Setty BN, Stuart MJ, Dampier C, Brodecki D, Allen JL. Hypoxaemia in sickle cell disease: biomarker modulation and relevance to pathophysiology. *Lancet*. 2003;362(9394):1450–5.
7. Young RC Jr, Rachal RE, Del Pilar Aguinaga M, et al. Automated oxyhemoglobin dissociation curve construction to assess sickle cell anemia therapy. *JAMA*. 2000;283(9):430–5.
8. Hannemann A, Weiss E, Rees DC, Dalibalta S, Ellory JC, Gibson JS. The properties of red blood cells from patients heterozygous for HbS and HbC (HbSC genotype). *Anemia*. 2011;2011:248527.
9. Mani S, Duffy TP. Sickle myonecrosis revisited. *Am J Med*. 1993; 95(5):525–30.
10. Chatel B, Messonnier LA, Bendahan D. Exacerbated in vivo metabolic changes suggestive of a spontaneous muscular vaso-occlusive crisis in exercising muscle of a sickle cell mouse. *Blood Cells Mol Dis*. 2017;65:56–9.
11. Malekgoudarzi B, Feffer S. Myonecrosis in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 1999;340(6):483.
12. Valeriano-Marcet J, Kerr LD. Myonecrosis and myofibrosis as complications of sickle cell anemia. *Ann Intern Med*. 1991;115(2): 99–101.
13. Hunt BJ, Korsah P, Eaton S, Brozovic M. Creatine kinase activity in sickle cell disease. *J Clin Pathol*. 1989;42(7):712–5.
14. Ravelojaona M, Feasson L, Oyono-Enguelle S, et al. Evidence for a profound remodeling of skeletal muscle and its microvasculature in sickle cell anemia. *Am J Pathol*. 2015;185(5):1448–56.
15. Vincent L, Feasson L, Oyono-Enguelle S, et al. Remodeling of skeletal muscle microvasculature in sickle cell trait and alpha-thalassemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298(2):H375–84.
16. Vincent L, Feasson L, Oyono-Enguelle S, et al. Skeletal muscle structural and energetic characteristics in subjects with sickle cell trait, alpha-thalassemia, or dual hemoglobinopathy. *J Appl Physiol (1985)*. 2010;109(3):728–34.
17. Belhassen L, Pelle G, Sediame S, et al. Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilatation. *Blood*. 2001;97(6):1584–9.
18. Pianosi P, D'Souza SJ, Charge TD, Béland MJ, Esseltine DW, Coates AL. Cardiac output and oxygen delivery during exercise in sickle cell anemia. *Am Rev Respir Dis*. 1991;143(2):231–5.
19. Quinn CT, Variste J, Dowling MM. Haemoglobin oxygen saturation is a determinant of cerebral artery blood flow velocity in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2009;145(4):500–5.
20. Waltz X, Pichon A, Lemonne N, et al. Normal muscle oxygen consumption and fatigability in sickle cell patients despite reduced microvascular oxygenation and hemorheological abnormalities. *PLoS One*. 2012;7(12):e52471.
21. Charlot K, Antoine-Jonville S, Moeckesch B, et al. Cerebral and muscle microvascular oxygenation in children with sickle cell disease: influence of hematology, hemorheology and vasomotion. *Blood Cells Mol Dis*. 2017;65:23–8.
22. Nahavandi M, Tavakkoli F, Hasan SP, Wyche MQ, Castro O. Cerebral oximetry in patients with sickle cell disease. *Eur J Clin Invest*. 2004;34(2):143–8.
23. Bendahan D, Chatel B, Jue T. Comparative NMR and NIRS analysis of oxygen dependent metabolism in exercising finger flexor muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2017; 313(6):R740–53.
24. Cahill LS, Gazdzinski LM, Tsui AK, et al. Functional and anatomical evidence of cerebral tissue hypoxia in young sickle cell anemia mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(3):994–1005.
25. Barden EM, Kawchak DA, Ohene-Frempong K, Stallings VA, Zemel BS. Body composition in children with sickle cell disease. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(1):218–25.
26. Dougherty KA, Schall JL, Rovner AJ, Stallings VA, Zemel BS. Attenuated maximal muscle strength and peak power in children with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2011;33(2):93–7.
27. Barden EM, Zemel BS, Kawchak DA, Goran MI, Ohene-Frempong K, Stallings VA. Total and resting energy expenditure in children with sickle cell disease. *J Pediatr*. 2000;136(1):73–9.
28. Charlot K, Moeckesch B, Jumeat S, et al. Physical activity level is not a determinant of autonomic nervous system activity and clinical severity in children/adolescents with sickle cell anemia: a pilot study. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(11):1962–7.
29. Chatel B, Hourde C, Gondin J, et al. Impaired muscle force production and higher fatigability in a mouse model of sickle cell disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2017;63:37–44.
30. Rowley CA, Ikeda AK, Seidel M, et al. Microvascular oxygen consumption during sickle cell pain crisis. *Blood*. 2014;123(20): 3101–4.
31. Liem RI, Reddy M, Pelligra SA, et al. Reduced fitness and abnormal cardiopulmonary responses to maximal exercise testing in children and young adults with sickle cell anemia. *Physiol Rep*. 2015;3(4):e12338.
32. Chatel B, Messonnier LA, Hourde C, Vilmen C, Bernard M, Bendahan D. Moderate and intense muscular exercises induce marked intramyocellular metabolic acidosis in sickle cell disease mice. *J Appl Physiol (1985)*. 2017;122(5):1362–9.
33. Miller GJ, Serjeant GR, Sivapragasam S, Petch MC. Cardiopulmonary responses and gas exchange during exercise in adults with homozygous sickle-cell disease (sickle-cell anaemia). *Clin Sci*. 1973;44(2):113–28.
34. Kaul DK, Fabry ME, Suzuka SM, Zhang X. Antisickling fetal hemoglobin reduces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in normoxic sickle mice: microvascular implications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;304(1):H42–50.
35. Freund H, Lonsdorfer J, Oyono-Enguelle S, Lonsdorfer A, Bogui P. Lactate exchange and removal abilities in sickle cell patients and in untrained and trained healthy humans. *J Appl Physiol*. 1992; 73(6):2580–7.
36. 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(3):398–407.
37. Moheeb H, Wali YA, El-Sayed MS. Physical fitness indices and anthropometrics profiles in schoolchildren with sickle cell trait/disease. *Am J Hematol*. 2007;82(2):91–7.
38. Millis RM, Baker FW, Ertugrul L, Douglas RM, Sexcius L. Physical performance decrements in children with sickle cell anemia. *JAMA*. 1994;86(2):113–6.
39. Connes P, Machado R, Hue O, Reid H. Exercise limitation, exercise testing and exercise recommendations in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2011;49(1–4):151–63.
40. Charrin E, Dube JJ, Connes P, et al. Moderate exercise training decreases inflammation in transgenic sickle cell mice. *Blood Cells Mol Dis*. 2018;69:45–52.
41. Martin C, Pialoux V, Faès C, Charrin E, Skinner S, Connes P. Does physical activity increase or decrease the risk of sickle cell disease complications? *Br J Sports Med*. 2015;52(4):214–8.
42. Ohara DG, Ruas G, Walsh IA, Castro SS, Jamami M. Lung function and six-minute walk test performance in individuals with sickle cell disease. *Braz J Phys Ther*. 2014;18(1):79–87.
43. Kohli DR, Li Y, Khasabov SG, et al. Pain-related behaviors and neurochemical alterations in mice expressing sickle hemoglobin: modulation by cannabinoids. *Blood*. 2010;116(3):456–65.
44. Capers PL, Hyacinth HI, Cue S, et al. Body composition and grip strength are improved in transgenic sickle mice fed a high-protein diet. *J Nutr Sci*. 2015;4:e6.
45. Vang D, Paul JA, Nguyen J, et al. Small-molecule nociceptin receptor agonist ameliorates mast cell activation and pain in sickle mice. *Haematologica*. 2015;100(12):1517–25.
46. Ong BA, Caboot J, Jawad A, et al. Respiratory muscle force and lung volume changes in a population of children with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2013;163(1):112–7.

47. Chirico EN, Pialoux V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life*. 2012;64(1):72–80.
48. Dougherty KA, Bertolaso C, Schall JI, Smith-Whitley K, Stallings VA. Muscle strength, power, and torque deficits in children with type SS sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2018;40(5):348–54.
49. Chatel B, Messonnier LA, Barge Q, et al. Endurance training reduces exercise-induced acidosis and improves muscle function in a mouse model of sickle cell disease. *Mol Genet Metab*. 2018;123(3):400–10.
50. Ameringer S, Smith WR. Emerging biobehavioral factors of fatigue in sickle cell disease. *J Nurs Scholarsh*. 2011;43(1):22–9.
51. Ameringer S, Elswick RK Jr, Smith W. Fatigue in adolescents and young adults with sickle cell disease: biological and behavioral correlates and health-related quality of life. *J Pediatr Oncol Nurs*. 2014;31(1):6–17.
52. Fitts RH. Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiol Rev*. 1994;74(1):49–94.
53. Chirico EN, Faës C, Connes P, Canet-Soulas E, Martin C, Pialoux V. Role of exercise-induced oxidative stress in sickle cell trait and disease. *Sports Med*. 2016;46(5):629–39.
54. Bergeron MF, Cannon JG, Hall EL, Kutlar A. Erythrocyte sickling during exercise and thermal stress. *Clin J Sport Med*. 2004;14(6):354–6.
55. Ueda Y, Bookchin RM. Effects of carbon dioxide and pH variations in vitro on blood respiratory functions, red blood cell volume, transmembrane pH gradients, and sickling in sickle cell anemia. *J Lab Clin Med*. 1984;104(2):146–59.
56. Callahan LA, Woods KF, Mensah GA, Ramsey LT, Barbeau P, Gutin B. Cardiopulmonary responses to exercise in women with sickle cell anemia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(9):1309–16.
57. Das BB, Sobczyk W, Bertolone S, Raj A. Cardiopulmonary stress testing in children with sickle cell disease who are on long-term erythrocytapheresis. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2008;30(5):373–7.
58. Bartolucci P, Habibi A, Khellaf M, et al. Score predicting acute chest syndrome during vaso-occlusive crises in adult sickle-cell disease patients. *EBioMedicine*. 2016;10:305–11.
59. Ratel S, Blazevich AJ. Are Prepubertal children metabolically comparable to well-trained adult endurance athletes? *Sports Med*. 2017;47(8):1477–85.
60. Connes P, Sara F, Hardy-Dessources MD, et al. Effects of short supramaximal exercise on hemorheology in sickle cell trait carriers. *Eur J Appl Physiol*. 2006;97(2):143–50.
61. Chirico EN, Martin C, Faës C, et al. Exercise training blunts oxidative stress in sickle cell trait carriers. *J Appl Physiol*. 2012;112(9):1445–53.
62. 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(1):39–52.
63. Kark JA, Posey DM, Schumacher HR, Ruehle CJ. Sickle-cell trait as a risk factor for sudden death in physical training. *N Engl J Med*. 1987;317(13):781–7.
64. Faës 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):124–30.
65. Hedreville M, Charlot K, Waltz X, et al. Acute moderate exercise does not further alter the autonomic nervous system activity in patients with sickle cell anemia. *PLoS One*. 2014;9(4):e95563.
66. Charifi N, Kadi F, Feasson L, Costes F, Geysant A, Denis C. Enhancement of microvessel tortuosity in the vastus lateralis muscle of old men in response to endurance training. *J Physiol*. 2004;554(Pt 2):559–69.
67. Messonnier LA, Emhoff CA, Fattor JA, Horning MA, Carlson TJ, Brooks GA. Lactate kinetics at the lactate threshold in trained and untrained men. *J Appl Physiol*. 2013;114(11):1593–602.
68. Costes F, Prieur F, Feasson L, Geysant A, Barthélémy JC, Denis C. Influence of training on NIRS muscle oxygen saturation during submaximal exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33(9):1484–9.
69. De Brandt J, Spruit MA, Derave W, Hansen D, Vanfleteren LE, Burtin C. Changes in structural and metabolic muscle characteristics following exercise-based interventions in patients with COPD: a systematic review. *Expert Rev Respir Med*. 2016;10(5):521–45.
70. Tinti G, Somera R Jr, Valente FM, Domingos CR. Benefits of kinesiotherapy and aquatic rehabilitation in sickle cell anemia. A case report. *Genet Mol Res*. 2010;9(1):360–4.
71. Zanoni CT, Galvao F, Cliquet Junior A, Saad ST. Pilot randomized controlled trial to evaluate the effect of aquatic and land physical therapy on musculoskeletal dysfunction of sickle cell disease patients. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015;37(2):82–9.
72. Camcioglu B, Bosnak-Guclu M, Karadalli MN, Akı ŞZ, Türköz-Sucak G. The role of Inspiratory muscle training in sickle cell anemia related pulmonary damage due to recurrent acute chest syndrome attacks. *Case Rep Hematol*. 2015;2015:780159.
73. Vincent L, Oyono-Enguelle S, Feasson L, et al. Effects of regular physical activity on skeletal muscle structural, energetic, and microvascular properties in carriers of sickle cell trait. *J Appl Physiol (1985)*. 2012;113(4):549–56.
74. Liem RI, Akinosun M, Muntz DS, Thompson AA. Feasibility and safety of home exercise training in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(12):e26671.
75. Al-Rimawi H, Jallad S. Sport participation in adolescents with sickle cell disease. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2008;6:214–6.
76. Waltz X, Hedreville M, Sinnapah 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(1):15–26.
77. Anthi A, Machado RF, Jison ML, et al. Hemodynamic and functional assessment of patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(12):1272–9.
78. Browning RC, Baker EA, Herron JA, Kram R. Effects of obesity and sex on the energetic cost and preferred speed of walking. *J Appl Physiol (1985)*. 2006;100(2):390–8.
79. Borghols EA, Dresen MH, Hollander AP. Influence of heavy weight carrying on the cardiorespiratory system during exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1978;38(3):161–9.
80. Pugh LG. The influence of wind resistance in running and walking and the mechanical efficiency of work against horizontal or vertical forces. *J Physiol*. 1971;213(2):255–76.
81. Davies SW, Jordan SL, Lipkin DP. Use of limb movement sensors as indicators of the level of everyday physical activity in chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol*. 1992;69(19):1581–6.
82. Kodama S, Saito K, Tanaka S, et al. Cardiorespiratory fitness as a quantitative predictor of all-cause mortality and cardiovascular events in healthy men and women: a meta-analysis. *JAMA*. 2009;30(19):2024–35.

# **OBJECTIFS ET HYPOTHESES DE RECHERCHE**

## 1. Objectifs de la thèse

Les travaux récemment réalisés par notre équipe ont mis en évidence un profond remodelage du tissu musculaire des patients drépanocytaires (Ravelojaona et al. 2015). De plus, la littérature rapporte que ces patients présentent une intolérance importante à l'effort, une force musculaire restreinte et une fatigabilité accrue (Connes et al. 2011 ; Dougherty et al. 2011 ; Waltz et al. 2012b). Comme la pratique d'une activité physique intense et/ou prolongée est proscrite pour eux, ces patients vont, par principe de précaution, adopter un style de vie « ultra-sédentaire ». Ainsi, ce style de vie sédentaire alimente les répercussions musculaires tissulaires et fonctionnelles, entraînant les patients dans un cercle vicieux en partie responsable de leur médiocre qualité de vie (Merlet et al. 2018). Dans la perspective d'une thérapie par l'exercice, l'entraînement en endurance semble concentrer les meilleurs arguments pour améliorer l'aptitude physique et la fonction musculaire, que ce soit dans la population générale ou dans celle présentant des situations physiopathologiques de fragilité musculaire importante (Orngreen et al. 2005 ; Sveen et al. 2007 ; Sveen et al. 2008 ; Bankole et al. 2016). Dans la drépanocytose, aucune étude pertinente, contrôlée, randomisée et réalisée sur une cohorte conséquente de patients drépanocytaires n'a, à ce jour, été menée.

Dans ce contexte, le challenge scientifique du projet « ExDre » est de dépasser le paradigme actuel selon lequel le sport et l'activité physique sans distinction, constituent un facteur de risque pour les patients drépanocytaires. Pour cela, l'objectif est de proposer un programme d'entraînement en endurance d'intensité modérée et compatible avec la contre-indication de la pratique d'une activité physique intense et/ou trop prolongée. L'hypothèse de ce projet est que **ce type d'entraînement pourrait représenter une stratégie thérapeutique efficace dans le but d'améliorer la capacité physique et la fonction musculaire des patients, ce qui pourrait contribuer à accroître leur autonomie et leur qualité de vie**. Les principaux résultats de ce projet seront présentés sous la forme d'un article « princeps » de cette étude, en amont de la partie sur la contribution personnelle. Cet article a été récemment accepté dans la revue *The Lancet Haematology* (Gellen et al. 2018).

L'objectif de ce travail doctoral a été **d'évaluer les caractéristiques du tissu musculaire squelettique des patients drépanocytaires en réponse à cet entraînement**. Les travaux de recherche s'appuient sur l'exploitation des biopsies musculaires obtenues lors du programme d'études « ExDre ». Leurs analyses ont permis de répondre à cet objectif et les résultats seront présentés au moyen de 3 études. Les études 1 et 2 avaient pour objectif d'évaluer l'impact de cet entraînement au niveau des caractéristiques du réseau

microvasculaire musculaire (étude 1) mais également au niveau structural et énergétique musculaire (étude 2). Une augmentation de la surface de section des fibres musculaires et une re-densification du réseau microvasculaire ayant été observées suite à l'entraînement (article princeps, études 1 et 2), l'étude 3 avait pour objectif l'analyse du potentiel régénératif musculaire associé aux cellules satellites, en réponse à cet entraînement.

## **2. Hypothèses de recherches**

### **2.1. Etude 1 : Bénéfices microvasculaires**

Que ce soit dans une population saine ou pathologique, il est désormais bien établi qu'un entraînement en endurance améliore le réseau microvasculaire musculaire. Cette adaptation se caractérise généralement par une augmentation de la densité capillaire et/ou de la tortuosité des microvaisseaux résultant en une plus grande surface d'échange entre les 2 compartiments et une meilleure oxygénation musculaire (Andersen & Henriksson, 1977 ; Messonnier et al. 2001 ; Charifi et al. 2004 ; Cocks et al. 2013 ; Gouzi et al. 2013 ; Baum et al. 2015 ; Cocks et al. 2015 ; Lewis et al. 2015). Chez les porteurs du trait drépanocytaire, l'étude de Vincent et al. (2012) met également en évidence une plus grande densité capillaire chez les sujets les plus actifs comparés aux sujets plus sédentaires. Cependant, les caractéristiques particulières du réseau microvasculaire des patients drépanocytaires sont susceptibles d'interférer sur ces bénéfices ou sur les mécanismes jusque-là décrits dans d'autres contextes. En effet, l'étude de Ravelojaona et al. (2015) met en évidence une raréfaction des microvaisseaux, une diminution de leur tortuosité mais aussi un élargissement de ces microvaisseaux, par rapport à ceux des sujets contrôles sains. Ces 2 derniers éléments pourraient être un mécanisme à la fois protecteur et adaptif permettant aux drépanocytes de passer plus facilement dans la microcirculation.

Dans ce contexte, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en réponse à un entraînement en endurance d'intensité modérée, l'oxygénation musculaire des patients drépanocytaires pourrait être essentiellement améliorée grâce à une augmentation de la densité capillaire. Notre seconde hypothèse est que la tortuosité resterait inchangée à l'issue de l'entraînement en raison des contraintes hémorhéologiques imposées par la rigidité des drépanocytes. Cela confirmerait que, la faible tortuosité observée chez les sujets porteurs du trait et les patients drépanocytaires (Vincent et al. 2010 ; Ravelojaona et al. 2015), serait un mécanisme physiopathologique adapté. D'autant que Vincent et al. (2012) a montré que la tortuosité microcapillaire demeurerait similaire que les patients porteurs du trait soient actifs ou sédentaires.



## **2.2. Etude 2 : Bénéfices structuraux et énergétiques**

La littérature rapporte fréquemment que la réponse à un entraînement en endurance consiste en une amélioration de la surface de section des fibres musculaires et de leur capacité oxydative par l'augmentation notamment de l'activité des enzymes mitochondriales aussi bien dans la population générale que pathologique (Maltais et al. 1996 ; Messonnier et al. 2001 ; Bankole et al. 2016). De plus, ce type d'entraînement augmente le contenu musculaire en protéines impliquées dans le transport du glucose et celles impliquées dans l'homéostasie du pH intramusculaire, en particulier dans le transport de H<sup>+</sup> à travers le sarcolemme (Juel, 2006). Puisque les patients drépanocytaires présentent une hypotrophie significative et des capacités oxydatives altérées, comparées à celles des sujets sains (Ravelojaona et al. 2015), nous pouvons donc émettre les hypothèses que ce type d'entraînement i) améliorera leur capacité oxydative musculaire, notamment par l'augmentation des activités enzymatiques de la filière aérobie (cycle de Krebs,  $\beta$ -oxydation et chaîne respiratoire mitochondriale), ii) augmentera le contenu musculaire en protéines impliquées dans le transport du glucose et potentiellement dans les mécanismes de régulation du pH et iii) augmentera la surface de section de fibres. Bien que ce résultat soit plus inconstant dans la littérature en particulier si l'intensité d'exercice est plafonnée, l'hypersédentarité des patients drépanocytaires est telle que l'entraînement en endurance pourrait suffire à « corriger » l'hypotrophie.

## **2.3. Etude 3 : Réponse et rôle du potentiel régénératif musculaire**

Les cellules satellites s'apparentent aux cellules souches du muscle squelettique. Le plus souvent identifiées comme quiescentes, elles jouent néanmoins un rôle essentiel dans la régénération myogénique en réponse à divers stimulations ou traumatismes (Buckingham, 2006 ; Cossu & Biressi, 2005 ; Relaix & Marcelle, 2009). Si le rôle de ces cellules dans l'hypertrophie musculaire générée par un entraînement en résistance est bien connu (pour revue, Murach et al. 2018), leurs implications au cours d'un entraînement en endurance demeurent controversées ou inconstantes (Abreu et al. 2017 ; Snijders et al. 2010). Cependant, plusieurs études ont montré, dans une population d'individus jeunes ou âgés, des signes d'activation de ces cellules (expansion et/ou activation) en réponse à ce type d'entraînement (Abreu et al. 2017 ; Charifi et al. 2004 ; Hoedt et al. 2016 ; Joanisse et al. 2013 ; Verney et al. 2008). Aussi, la légère hypertrophie des fibres musculaires (Gellen et al. article princeps ; Merlet et al. étude 2) et la relative re-densification du réseau microvasculaire observé après l'entraînement (Merlet et al. étude 1) sont des arguments en faveur d'une potentielle implication des cellules satellites (Christov et al. 2007 ; Nederveen et al. 2018 ; Mounier et al. 2011). De ce fait, les objectifs de cette étude étaient donc d'identifier et de

comparer le contenu en cellules satellites des échantillons musculaires prélevés chez les 2 groupes de patients avec ou sans entraînement, et d'observer la possible mise en jeu de ces acteurs du potentiel régénératif musculaires. Dans ce contexte d'entraînement en endurance particulièrement modéré, nous émettons les hypothèses qu'il i) ne devrait pas engendrer de dégradation tissulaire et ainsi ne pas engager de réel processus régénératif mais ii) que cet entraînement pourrait néanmoins activer les cellules satellites de sorte qu'elles puissent contribuer au discret gain de taille observé sur les fibres musculaires entraînées.

# **MATERIELS ET METHODES**

## 1. Population étudiée

Quarante patients volontaires drépanocytaires homozygotes ont participé à cette étude qui s'est déroulée au sein de l'unité de réadaptation cardiaque et de l'unité d'exploration fonctionnelle et respiratoire des Hôpitaux Universitaires Henri Mondor de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (APHP), dans le centre de référence pour les syndromes drépanocytaires majeurs à Créteil (France). Les participants ont été informés des buts, des procédures et des risques et/ou inconforts possiblement associés au protocole avant de donner leur consentement éclairé par écrit. L'étude a été approuvée par le Comité de Protection de Personnes SUD-EST I (CPP-2014-14), est enregistrée à ClinicalTrials.gov (NCT02571088), et est conforme aux normes fixées par la Déclaration d'Helsinki pour les études humaines.

- Critères d'inclusions

Les patients présentant les critères suivants ont été inclus dans l'étude :

- Patients âgés de plus de 18 ans,
- Patients de sexe masculin ou féminin,
- Patients atteints de drépanocytose  $\beta^S\beta^S$  ou  $\beta^S\beta^0$  thalassémie
- Patients affiliés à un régime de sécurité sociale,
- Patients ayant donné librement leur consentement écrit après avoir été informés du but, du déroulement et des risques potentiels encourus,
- Patients en état stabilisé au début de l'expérimentation : au moins 1 mois après un évènement chronique aigu ou au moins 3 mois après une transfusion sanguine.

- Critères d'exclusions

Les patients présentant les critères suivants n'ont pas été inclus dans l'étude :

- Patients participant à un autre essai clinique,
- Patients porteurs d'une pathologie inflammatoire ou infectieuse chronique,
- Patients ayant eu une affection intercurrente au cours du dernier mois précédant l'inclusion,
- Patients présentant des signes cliniques d'insuffisance cardiaque ou hospitalisés pour décompensation cardiaque au cours des 12 derniers mois,
- Patients avec une fraction d'éjection ventriculaire gauche <50%, une hypertension artérielle pulmonaire avec vitesse de régurgitation tricuspide > 2,8 m/s, une fibrillation atriale, des arythmies ventriculaires, une hypertrophie ventriculaire

gauche, une valvulopathie importante, une maladie coronarienne avérée, une hypertension non contrôlée,

- Patients avec un traitement contre l'arythmie cardiaque, y compris des bêta-bloquants,
- Patients sous traitement anticoagulant,
- Patients avec un pacemaker ou défibrillateur,
- Patient avec une vasculopathie cérébrale connue et/ou des antécédents d'accident vasculaire cérébral et/ou d'épilepsie,
- Patientes enceintes ou allaitantes,
- Patients dans l'incapacité de comprendre le but, les conditions de déroulement et les risques possibles du protocole d'étude.

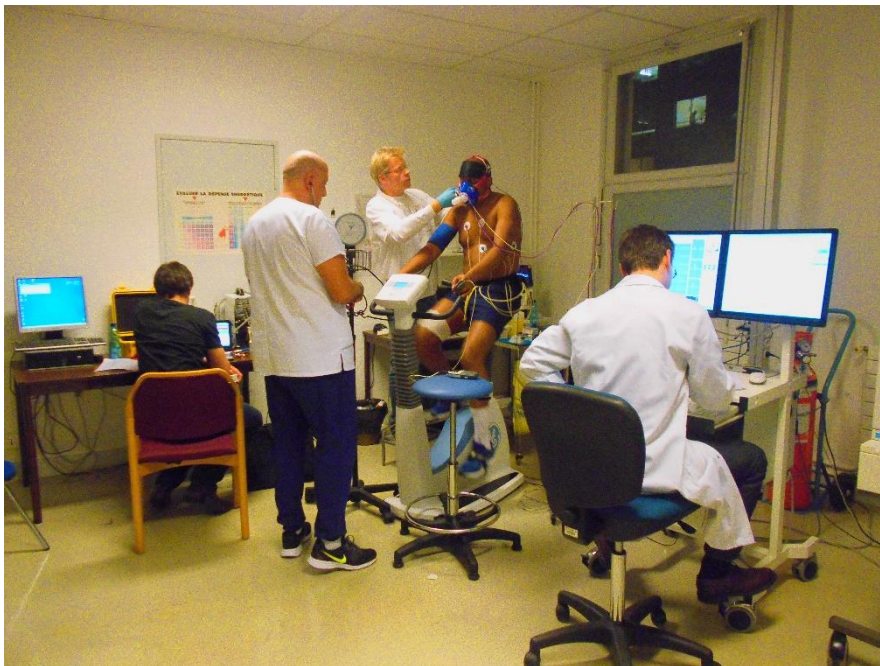
## **2. Design expérimental**

Les patients ont été randomisés en 2 groupes : un groupe entraînement (N = 20) et un groupe contrôle (N = 20). Les patients ont effectué successivement : i) un exercice incrémental sous-maximal et, au moins 5 jours après, une première biopsie musculaire, iii) l'entraînement d'une durée de 8 semaines (groupe entraîné) ou le maintien des activités habituelles (groupe contrôle), et iv) un deuxième exercice incrémental sous-maximal et, au moins 5 jours après, une deuxième biopsie musculaire. Les patients du groupe entraînement ont réalisé un programme de rééducation spécifique encadré dans le service de réadaptation cardiaque selon les modalités détaillées plus bas. La Figure 28 schématise ce design expérimental.

### **2.1. Exercice incrémental sous-maximal**

Afin d'apprécier la capacité à l'exercice des patients drépanocytaires et son potentiel changement sous l'effet de l'entraînement en endurance, un test incrémental sous maximal réalisé sur cycloergomètre (Figure 27) a été mis au point. Compte-tenu de l'impossibilité pour ces patients à réaliser un effort intense et/ou prolongé, le test incrémental maximal classique n'était pas envisageable. Il a ainsi été proposé un test incrémental suffisamment sous-maximal pour que la survenue de l'acidose, estimée de manière indirecte par une mesure de la concentration sanguine de lactate, soit contrôlée et restreinte aux limites supposées sécuritaires. L'exercice commençait à une puissance de 20 ou 30 W incrémentée toutes les 2 minutes, de 10 W pour les femmes et 15 W pour les hommes. La concentration sanguine de lactate a été mesurée au repos et durant chaque minute de l'exercice en prélevant 10 µL de sang au niveau du lobe de l'oreille. Ce prélèvement était immédiatement analysé et le résultat obtenu en moyenne en 20 secondes. L'exercice était stoppé lorsque la concentration sanguine

du lactate était  $\geq 4$  mmol/L (Figure 28B). Le choix de se référer à la valeur de puissance pour la concentration de 4 mmol/L de lactate lors de cette épreuve progressive, permet d'atteindre un niveau d'effort satisfaisant tout en engageant déjà les différentes voies métaboliques énergétiques d'intérêt mais en limitant l'exercice à une intensité en deçà de la zone de risque. La saturation artérielle en oxygène ( $SpO_2$ ) a été suivie en continu tout au long du test par oxymétrie de pouls au bout d'un doigt. Des paramètres cardio-pulmonaires ont également été mesurés en continu lors du test. Ce protocole a donc permis de déterminer les puissances d'exercice : i) au premier seuil lactique, ii) à environ 2,5 mmol/L (puissance utilisée lors du protocole d'entraînement) et iii) à 4 mmol/L, critère principal de réponse à l'entraînement.



**Figure 27 : Patient drépanocytaire lors du test incrémental sous-maximal.**

## **2.2. Protocole d'entraînement en endurance**

Le programme d'entraînement s'est déroulé au sein de l'unité de réadaptation cardiaque et de l'unité d'exploration fonctionnelle et respiratoire située dans les Hôpitaux Universitaires Henri Mondor (APHP) à Créteil. Les patients du groupe entraînement ont effectué un programme d'entraînement en endurance sur cycloergomètre pendant 8 semaines (ou 9 semaines en fonction de la présence de jours fériés pendant les 8 semaines) à raison de 3 séances par semaine (soit 24 séances programmées et attendues au total). Chaque séance consistait successivement en :

- Un échauffement initial de 5 minutes à 70% de la puissance cible d'entraînement, correspondant à une lactacidémie de 2,5 mmol/L, proche du premier seuil lactique,

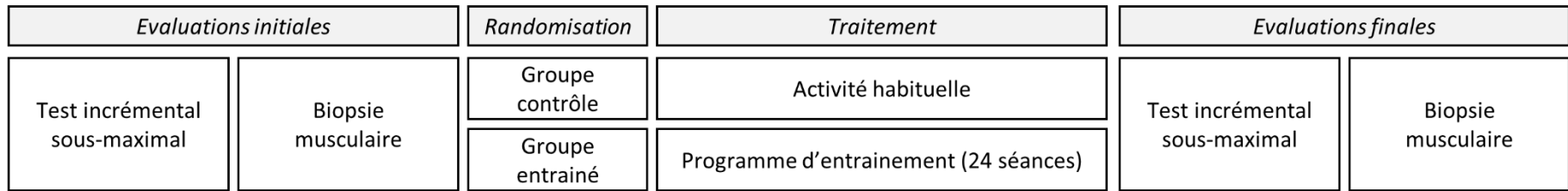
incluant une montée progressive jusqu'à la charge d'entraînement, passant de 70% à 100% de cette puissance cible, sur une durée de 2 minutes.

- Une phase d'entraînement en endurance à 100% de la puissance cible d'entraînement pendant 30 minutes. Les patients pédalaient à une fréquence de confort d'environ 60 tours par minute.
- Une diminution progressive de la charge d'entraînement passant de 100% à 70% de la puissance cible sur 2 minutes suivie d'une phase de récupération active de 3 minutes à 70% de la puissance cible.
- Puis des étirements légers durant 5 minutes (Figure 28C).

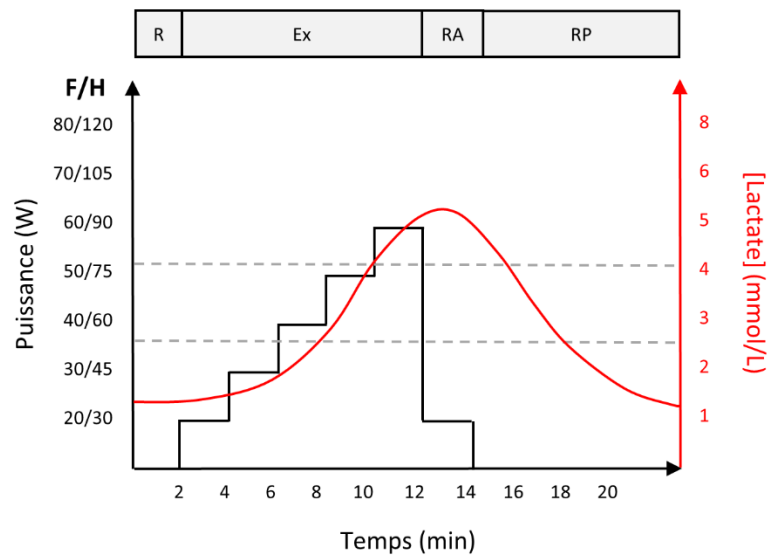
La durée de chaque séance était limitée à 45 min pour tous les patients, afin de ne pas induire de perturbations hémorhéologiques et de prévenir la déshydratation. Lors de chaque séance, un médecin était présent pour assurer la surveillance clinique des patients. Au cours de ces séances, la SpO<sub>2</sub>, la fréquence cardiaque et la concentration sanguine du lactate ont été régulièrement évaluées, afin d'assurer la sécurité et l'absence de dérive de la lactatémie. Si nécessaire, la charge d'entraînement a été ajustée au fil de l'entraînement, en fonction de la lactatémie mesurée lors de la séance, selon le schéma suivant :

- Égale à  $2,5 \pm 0,3$  mmol/L, aucun changement n'était réalisé
- Comprise entre 2,9 et 3,2 mmol/L, la puissance d'entraînement était diminuée de 5%
- Égale à 3,3-3,6 mmol/L, la puissance d'entraînement était diminuée de 10%
- Supérieure à 3,7 mmol/L, la puissance d'entraînement était diminuée de 20%
- Égale à 1,9-2,1 mmol/L, la puissance d'entraînement était augmentée de 5%
- Égale à 1,6-1,8 mmol/L, la puissance d'entraînement était augmentée de 10%
- Inférieure à 1,5 mmol/L, la puissance d'entraînement était augmentée de 20%.

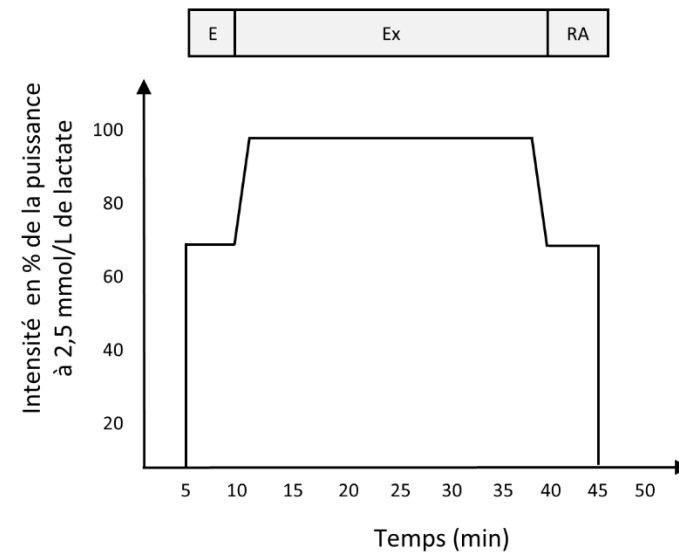
**A**



**B**



**C**



**Figure 28 : Représentation schématique du protocole expérimentale.**

A, design expérimentale ; B, test incrémental sous-maximal ; C, protocole d'entraînement. R, repos ; Ex, exercice de pédalage ; RA, récupération active ; RP, récupération passive, E, échauffement.



### 2.3. Biopsie musculaire

Tous les échantillons musculaires ont été obtenus, la semaine avant et après la période dite « d'entraînement » de 8 semaines par une biopsie réalisée sur le muscle *vastus lateralis*, selon la technique percutanée décrite par Henriksson et maîtrisée de longue date par notre équipe (Henriksson, 1979 ; Féasson et al. 1997) (Figure 29). Après le rasage, l'asepsie a été obtenue à l'aide d'alcool et d'iso-Bétadine 10% (MEDA Pharma, Paris, France). Ensuite, une anesthésie locale des tissus cutanés et sous-cutanés a été réalisée (lidocaïne à 2%, AstraZeneca, Rueil-Malmaison, France), sans traverser l'aponévrose musculaire. Une petite incision (ne dépassant pas 8 mm) a été réalisée jusqu'au croisement de l'épimysium, par lequel la pince Weil-Blakesley (Lawton, Tittlingen, Allemagne) a été introduite dans le muscle sous-jacent, et l'échantillon extrait après section par la pince. Une quantité de tissu musculaire d'environ 150 à 200 mg a été obtenue à l'issue de 2 à 4 « passages » par cette même voie d'abord. Puis une compression de 5 minutes a été effectuée pour assurer l'hémostase. L'incision a ensuite été refermée par des bandes adhésives stériles que le patient gardait pendant 5 jours (Feasson et al. 1997). La partie de l'échantillon de biopsie contenant les fascicules les plus structurés a été orientée sous un microscope stéréoscopique et montée dans du cryomount® (Histolab, Göteborg, Suède), puis congelée dans de l'isopentan (Chevron Phillips Chemicals International, Overijse, Belgique). Ces échantillons ont été stockés dans l'azote liquide dans l'attente des analyses histochimiques et immunohistochimiques. Les autres échantillons musculaires ont été directement congelés et stockés dans de l'azote liquide en vue des analyses enzymatiques, des mesures de contenu protéique par immunoblots.



**Figure 29 : Biopsie musculaire d'une patiente drépanocytaire (à gauche) et image d'un extrait musculaire (à droite).**

### **3. Analyse du tissu musculaire**

#### **3.1. Analyses histologiques**

Pour les analyses présentées ci-dessous, des coupes sériées de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome à cryostat (Microm HM 560, Microm, Walldorf, Germany) maintenues à  $-20^{\circ}\text{C}$ , puis montées sur lames suivantes :

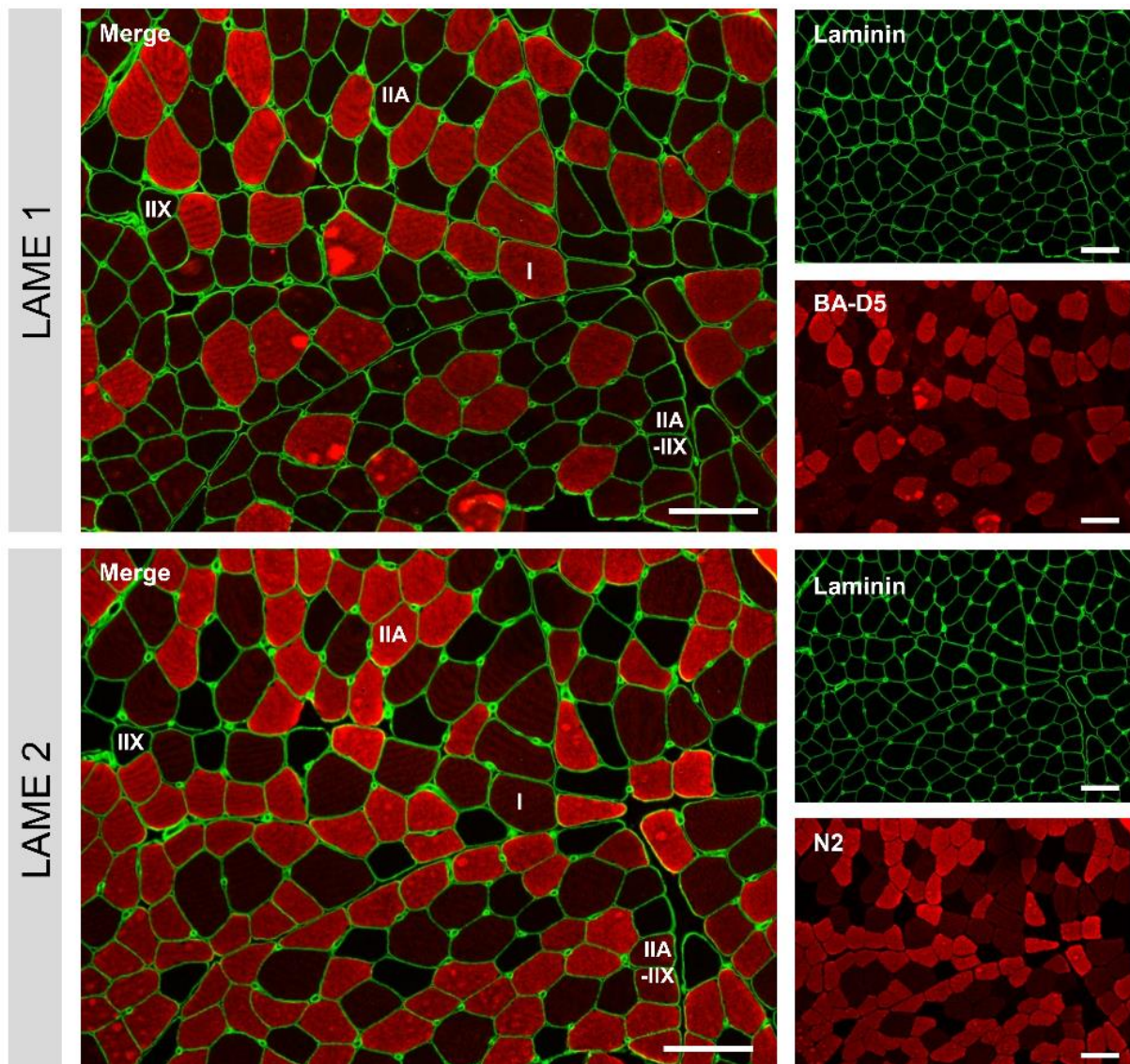
- 2 lames dédiées à la morphométrie et la typologie des fibres
- 1 lame pour l'analyse du réseau microvasculaire
- 2 lames pour l'analyse de l'activité de la cytochrome c oxidase (COx) et de la COx/succinate déshydrogénase (SDH)
- 2 lames pour l'étude plus spécifique des cellules satellites

##### **3.1.1. Analyse de la morphométrie et de la typologie des fibres**

L'analyse de la morphométrie et de la typologie des fibres musculaires a été effectuée par immunofluorescence sur des coupes sériées (Figure 30). Les 2 lames utilisées ont été traitées avec l'anticorps anti-laminin- $\alpha 2$  (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France), conjugué à l'anticorps alexa-fluor 488 anti-rabbit (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) pour identifier la matrice extracellulaire. Ensuite sur ces 2 lames, les différents types de fibres ont été identifiés en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre les chaînes lourdes de myosine, MHC1

(BA-D5, DSHB) ou MHCIIA (N2.261, Enzo life Sciences) conjugués avec l'anticorps secondaire alexa-fluor 546 anti-mouse (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).











Les images des coupes ont été réalisées avec une caméra numérique DP-72 couplée à un microscope BX-51 (Olympus, Rungis, France) à une résolution de 0,64  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ . Environ 3 champs représentatifs de 120 fibres musculaires par coupe, ont été sélectionnés. A l'aide du logiciel de traitement d'image Visilog-6.9 (Noesis, Gif-sur-Yvette, France), les mesures de surface et du périmètre, ainsi que la détermination du typage (I, I-IIA, IIA, IIA-IIIX et IIX) à l'aide du Tableau 5 des fibres musculaires ont été obtenues, comme décrit par Meunier et al. (2010). En moyenne, 300 fibres musculaires ont été analysées pour chaque coupe, dans chaque condition histologique.



**Figure 30 : Montage en immunofluorescence de coupes sériées dédiées à l'analyse de la morphométrie et de la typologie des fibres musculaires.**

La lame 1 correspond à un montage Laminin+BA-D5 et la lame 2 à un montage Laminin+N2 permettant respectivement d'identifier spécifiquement les types de myosine MHC I et MHCIIA. L'intensité de coloration permet de mettre en évidence 5 types de fibres musculaires grâce au Tableau 5. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$ .

**Tableau 5 : Interprétation des différents types de fibres.**

	<i>Type I</i>	<i>Type I-IIA</i>	<i>Type IIA</i>	<i>Type IIA-IIX</i>	<i>Type IIX</i>
<i>Ac BA-D5</i>					
<i>Ac N2</i>					

### 3.1.2. Analyse du réseau microvasculaire

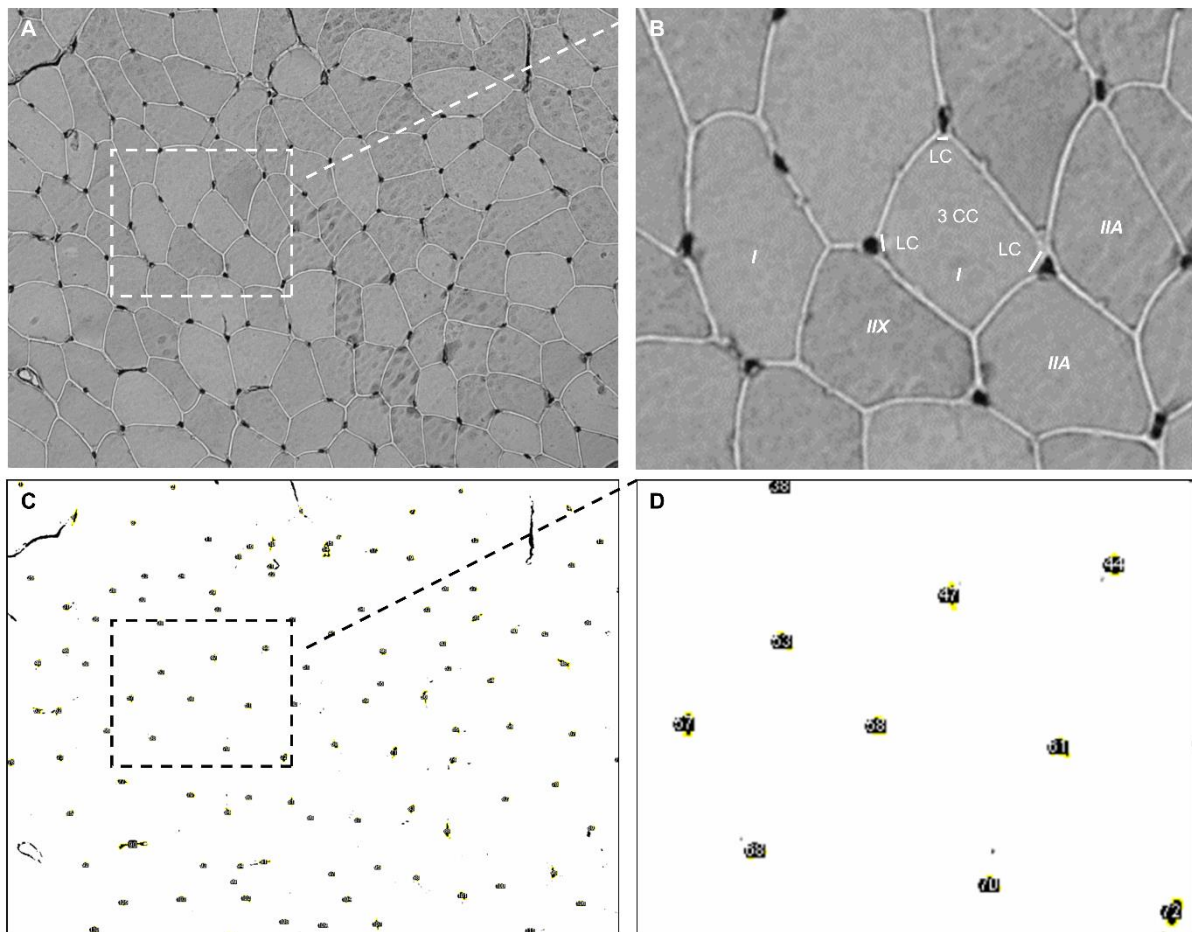
L'analyse immunohistochimique du réseau microvasculaire musculaire a été effectuée en utilisant l'anticorps CD31 (Dako, Glostrup, Danemark), qui reconnaît la molécule-1 d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaires également exprimée dans les cellules endothéliales microvasculaires. Des anticorps secondaires (lapin anti-souris, Dako P260), puis tertiaires (porc anti-lapin, Dako P217) ont ensuite été hybridés. La reconnaissance de cet antigène par les anticorps spécifiques a ensuite été révélée par la réaction chromogène peroxydase, couplée aux anticorps secondaires et tertiaires.

Comme précédemment, les images ont été obtenues avec une caméra numérique DP-72 couplée à un microscope BX-51 (Olympus, Rungis, France) à une résolution de 0,64  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ , sur les mêmes champs définis pour l'analyse de la typologie des fibres. Ainsi, la retranscription de la typologie des fibres musculaires pour l'analyse microvasculaire a pu être réalisée en série. Le logiciel ImageJ a permis l'analyse semi-automatique d'une partie des différents indices listés ci-dessous :

- L'aire des capillaires
- Le périmètre des capillaires
- Le diamètre extérieur des capillaires
- La tortuosité des capillaires (CapTor)
- La longueur de contact entre une fibre musculaire et les capillaires environnants (LC)
- La densité capillaire
- Le nombre de capillaires en contact avec une fibre musculaire (CAF)
- Le rapport LC/PF qui informe sur la surface d'échange entre une fibre musculaire et les capillaires environnants.

Les indices LC/PF et CAF ont été analysés en fonction du type de fibres en considérant en moyenne un minimum de 25 fibres par type. Cependant, pour ces analyses, seuls 3 types de fibres ont été pris en compte : les fibres musculaires de type I, IIA et IIX. Les fibres « hybrides » de types I-IIA et IIA-IIX ont été respectivement associées aux types I et IIA.





**Figure 31 : Analyse des indices de microvascularisation.**

A et B : Image du réseau microvasculaire marqué avec l'anticorps CD31. Sur cette image, l'analyse des indices CAF et LC/PF en fonction du type de fibres a été réalisée ; C et D : Utilisation du logiciel ImageJ pour l'analyse semi-automatique de la densité, la surface, le périmètre et la tortuosité des capillaires.

### 3.1.3. Analyse histochimique de l'activité COx

L'activité COx histochimique reflète le fonctionnement du quatrième complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale. Son activité est révélée par une coloration brune, issue de la précipitation de la Diaminobenzidine.

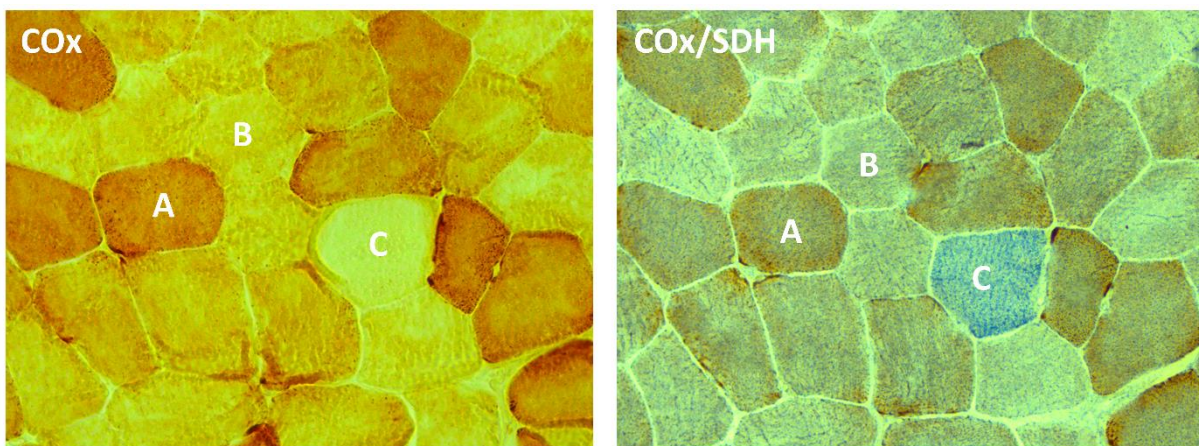
L'acquisition des images a été réalisée sur les mêmes champs que ceux définis pour l'analyse de la typologie des fibres. A l'aide du logiciel Progenesis SameSpots, la typologie des fibres musculaires a été retranscrite sur l'image COx correspondante. L'analyse histochimique de son activité a été effectuée en mesurant la densité optique de chaque fibre musculaire avec le logiciel Visilog-6.9 (Noesis, Gif-sur-Yvette, France). L'expression de l'activité de la COx peut être :

- Intense : coloration foncée, activité COx élevée,
- Faible : coloration claire, activité COx modeste,

- Extrêmement faible : absence de coloration, activité COx très faible voire absente (Figure 32).

#### 3.1.4. Technique histochimique combinée COx/SDH

Une double coloration des activités COx et succinate déshydrogénase (COx/SDH) permet l'appréciation de la proportionnalité de ces activités, et par extension la cohérence de fonctionnement des 4<sup>èmes</sup> et 2<sup>èmes</sup> cytochromes de la chaîne respiratoire (CIV et CII). Cette préparation permet de confirmer et de localiser la déficience plus spécifique en COx, de certaines fibres musculaires. La coloration COx est réalisée en amont de la coloration SDH. L'activité de la SDH est révélée par la transformation du succinate de sodium en fumarate provoquant une libération des atomes d'hydrogène. Ces atomes se combinent à une solution de NBT, responsable de la coloration bleue de la fibre musculaire en présence de SDH. La double coloration COx/SDH donne un gradient de couleur allant de gris à marron. La présence de cellules bleues met en évidence le déficit partiel ou complet de l'activité de la COx sur la section de fibres musculaires concernées, alors que son activité SDH demeure normale.



**Figure 32 : Histoenzymologie des activités COx (à gauche) et COx/SDH combinées (à droite).** Sur les 2 coupes sériées. A : fibre oxydative avec une forte activité COx ; B : activité COx restreinte sur une fibre probablement glycolytique ; C : activité COx très faible voire nulle alors que l'activité SDH demeure normale, expliquant la couleur bleue de cette fibre au métabolisme perturbé.

#### 3.1.5. Analyse du potentiel régénératif

L'analyse du potentiel régénératif a été effectuée par immunofluorescence sur 3 coupes sériées dédiées (Figure 33 et Figure 34). Sur la première lame, les anticorps CD56 (Dako, Santa Clara, Californie) et anti-laminin- $\alpha$ 2 (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) ont été conjugués aux anticorps secondaires alexa fluor 488 anti-mouse et alexa-fluor 546 anti-rabbit (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) afin d'identifier respectivement les cellules satellites et la matrice extracellulaire. Sur la deuxième et la troisième lame, les anticorps CD56 (Dako, Santa Clara, Californie) et Ki67 (Abcam, Cambridge, UK) ont été conjugués aux anticorps alexa fluor

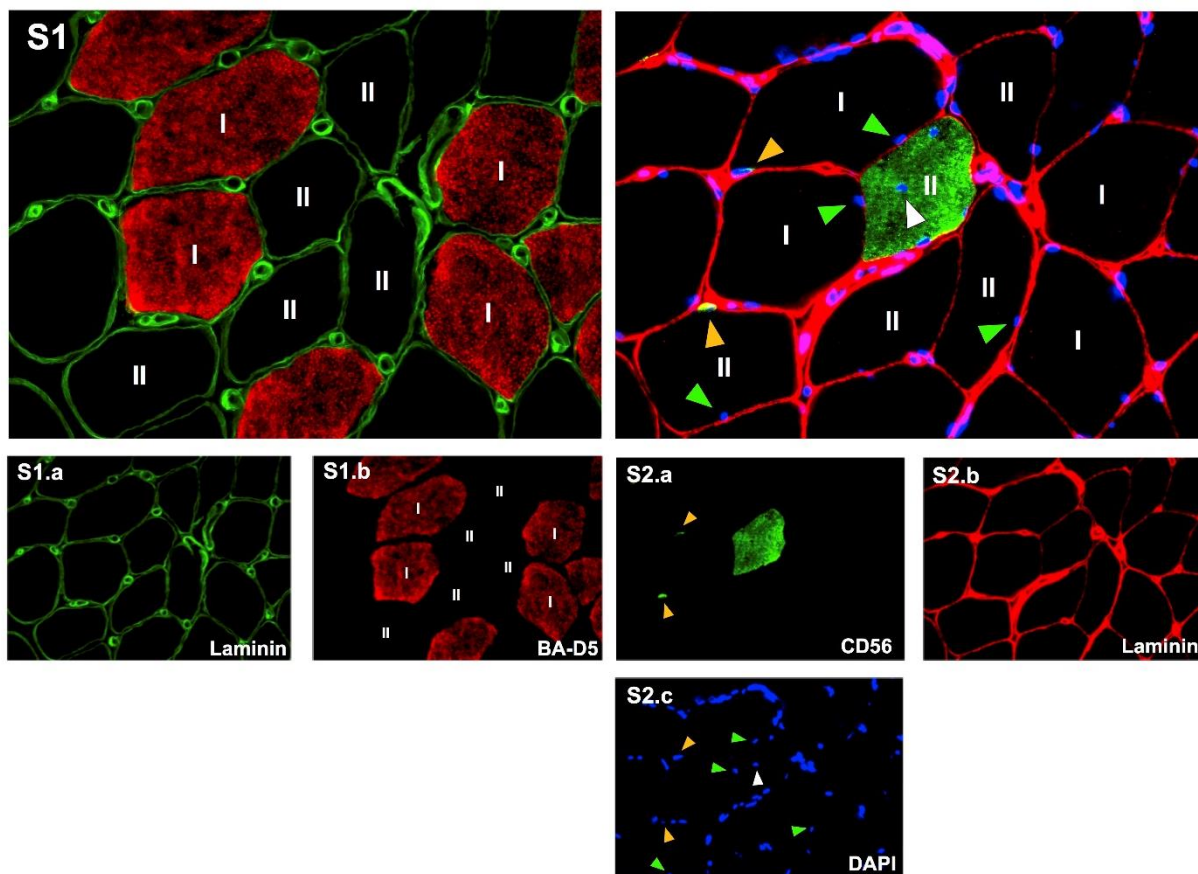
546 anti-mouse et alexa-fluor 488 anti-rabbit (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) afin d'identifier respectivement l'ensemble des cellules satellites et uniquement les cellules satellites activées. Ces 2 lames ont été montées avec du milieu de montage DAPI (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) afin d'identifier avec certitude les noyaux.

Les images ont été obtenues avec une caméra digitale à champs large (DP74, Olympus, Japan) couplée à un microscope à épifluorescence inversée IX81 (Olympus, Tokyo, Japon), à un grossissement x10 et enregistrées en très haute résolution (20 millions de pixels). Les images des lames 2 et 3 ont été réalisées sur un même champ comprenant en moyenne 400 fibres musculaires. Sur ce même champ, une image de la lame 1 Laminin/BA-D5 a été prise afin d'associer l'analyse typologique des fibres musculaires (type I *versus* II) à l'analyse du potentiel régénératif. Le logiciel ImageJ a permis l'analyse semi-automatique de l'aire et du périmètre des fibres musculaires. L'analyse du potentiel régénératif a été effectuée avec la mesure des différents indices listés ci-dessous :

- Le nombre de cellules satellites
- Le nombre de myocytes en régénération (cytoplasme CD56+)
- Le nombre de cellules satellites activées (CD56+/Ki67+)
- Le nombre de myonucléi/fibres
- L'aire des fibres
- Le domaine myonucléaire de chaque fibre
- Le nombre de noyaux internalisés (situés au sein du cytoplasme et non accolés sous le sarcolemme d'un myocyte)

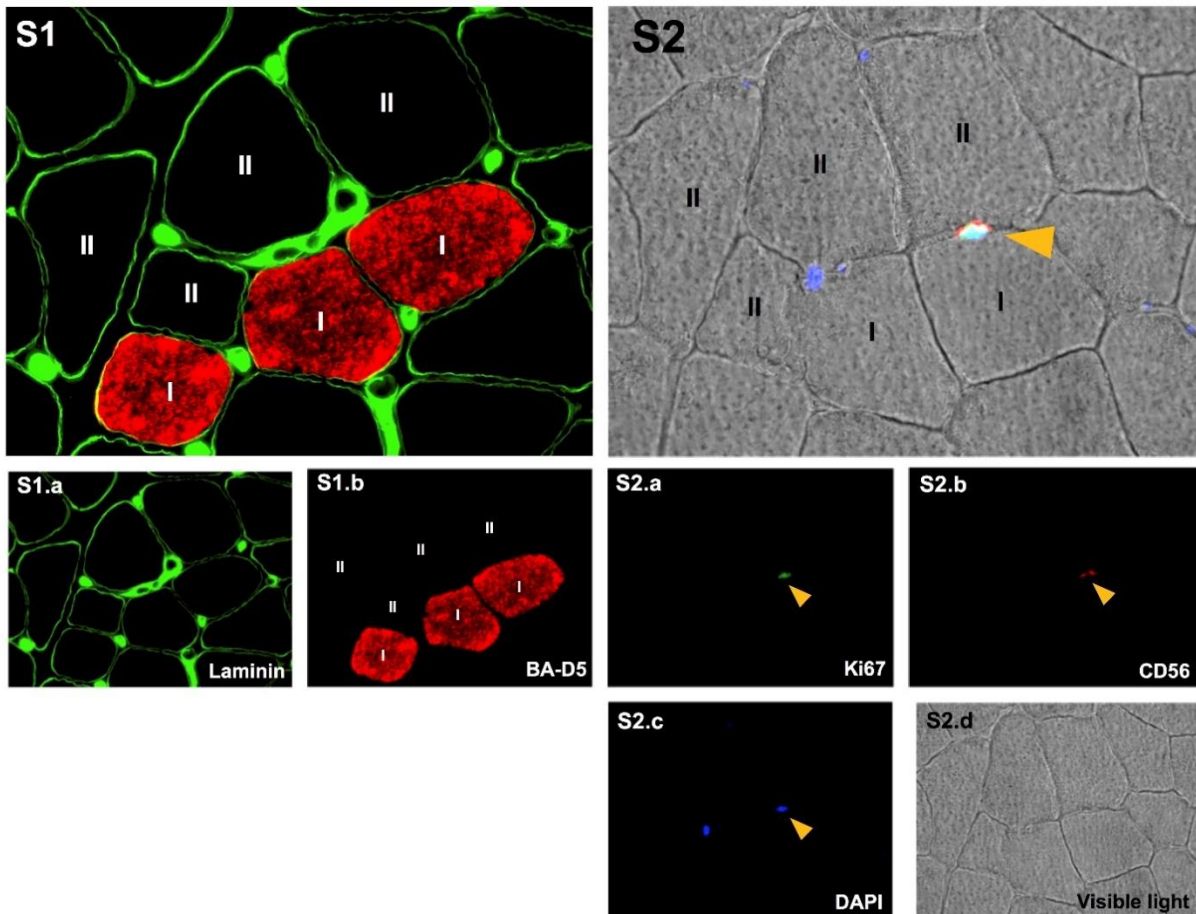
Ces indices ont été analysés en fonction de la typologie des myocytes (type I *versus* II).





**Figure 33 : Etude du potentiel régénératif musculaire à partir des lames sériées 1 et 2.**

La lame 1 (à gauche) met en évidence la distribution des types de fibres à l'aide de l'anticorps BA-D5 (rouge) reconnaissant les chaînes lourdes de myosine I (MHCI). La deuxième lame (à droite) met en évidence les cellules satellites marquées par l'anticorps CD56 (vert) et l'ensemble des noyaux (DAPI, bleu). Sur les 2 lames, la matrice extracellulaire a été marquée (anticorps anti-laminine- $\alpha 2$ ) pour distinguer le contour des fibres (en vert à gauche et en rouge à droite). Sur les 2 lames, la typologie a été obtenue I *versus* II. A droite, les cellules satellites sont identifiables par la colocalisation des marquages CD56 et DAPI (marquées d'une flèche jaune). Des myonucléi sont correctement disposés sous le sarcolemme (flèche verte) alors que d'autres noyaux sont internalisés (flèche blanche). Le marquage cytosolique en vert d'une fibre, révèle un myocyte en régénération. Ces lames sériées ont permis l'analyse de la distribution par types de fibre, de l'aire des fibres, du nombre de myonucléi, le domaine myonucléaire, le nombre de cellules satellites et de noyaux internalisés et le nombre de fibres en régénération.



**Figure 34 : Etude du potentiel régénératif musculaire à partir des lames sériées 1 et 3.**

La lame 1 (à gauche) met en évidence la distribution par types de fibre avec l'anticorps BA-D5 (rouge) marquant les chaînes lourdes de myosine 1 (MHCI). La deuxième lame (à droite) met en évidence par l'anticorps CD56, les cellules satellites (rouge). Parmi elles, celles qui sont activées expriment aussi l'anticorps Ki67, marqueur de prolifération nucléaire (vert). Le DAPI (bleu) assure qu'il s'agit d'un noyau cellulaire. A droite, la flèche jaune marque une cellule satellite active (triple co-localisation CD56, DAPI et Ki67). La lumière visible a été utilisée afin de repérer le pourtour des fibres et de retrouver le sérié. Sur les 2 lames, la typologie a été distinguée I *versus* II.

### 3.2. Mesure des activités enzymatiques en spectrométrie

Le dosage spectrométrique des activités maximales de plusieurs enzymes impliquées dans les différentes voies du métabolisme énergétique, nous renseigne sur la fonctionnalité potentielle de ces enzymes dans les extraits musculaires issus des biopsies. La capacité maximale de ces enzymes à dégrader leur substrat s'observe par la cinétique de dégradation du substrat ou de formation d'un produit final. Le suivi de ces cinétiques par spectrophotométrie nous permet de mesurer l'activité optimale de ces enzymes pour un extrait musculaire donné (Lowry & Passoneau, 1972).

Ces analyses d'activités enzymatiques ont été réalisées par mesure d'absorbance avec un lecteur de plaque (CLARIOstar, BMG LABTECH GmbH, Allemagne) selon les méthodes standards (Lowry & Passoneau, 1972). Pour chaque biopsie, un fragment musculaire a été

broyé à l'aide d'un ultra-turrax (T8 IKA-Werke, Staufen, Allemagne), puis traité par une extraction chimique (voir détail en annexe). La concentration protéique de chaque échantillon a ensuite été estimée par technique spectrométrique avec de l'albumine sérique bovine (BSA) utilisée comme standard (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Les dosages des activités de la myokinase (MK), de la créatine kinase (CK), de l'énolase (ENO), de la lactate déshydrogénase (LDH), de la citrate synthase (CS), de la  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase ( $\beta$ -HAD), et des complexes II (CII) et IV (CIV) de la chaîne respiratoire ont été réalisés par mesure de densité optique (DO) et obtenus selon la formule ci-dessous :

$$UI/mg = \frac{\Delta DO}{\text{min}} * \frac{\pi * R^2}{\varepsilon * \text{volume échantillon} * [C \text{ échantillon}]}$$

Avec, delta ( $\Delta$ )DO/min : pente,  $R^2$  : rayon du puits en cm, volume échantillon : volume de l'échantillon déposé dans la plaque en  $\mu\text{L}$ , [C échantillon] : concentration de l'échantillon dilué déposé dans le puits en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,  $\varepsilon$  : coefficient d'extinction de la molécule en L/mmol/cm. Pour les dosages de MK, CK, ENO, LDH et  $\beta$ -HAD, ce coefficient d'extinction du  $\beta$ -NADH était égal à 6,2 ; pour le dosage de la CS, le coefficient d'extinction du 5,5' dithiobis 2 nitrobenzoic acid (DTNB) était égal à 13,8 ; pour le dosage du CII, le coefficient d'extinction du 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCPIP) était de 19,2 et pour le dosage du CIV, le coefficient d'extinction du COx était de 18,5.

Les détails des protocoles utilisés pour l'analyse de chaque activité enzymatique sont présentés en annexe.

### 3.3. Analyse des contenus protéiques musculaires par western blot

L'analyse du contenu musculaire de plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et les mécanismes de régulation du pH a été réalisée par western blot. Cette technique permet d'identifier et d'estimer la quantité d'une protéine d'intérêt contenue dans un échantillon tissulaire, par son niveau d'expression révélé par immunomarquage spécifique à l'issue d'une séparation électrophorétique. Cependant, cette méthode de quantification demeure semi-quantitative. Pour ces analyses, les protéines d'un fragment musculaire ont été extraites de façon mécanique (Polythron PT 1200 E, Kinematica, Suisse) et chimique. La concentration protéique de l'échantillon a ensuite été estimée par spectrométrie avec de la BSA utilisée comme standard (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Les 5 complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, le transporteur de glucose GLUT4, les transporteurs de monocarboxylates 1 (MCT1) et 4 (MCT4) et les anhydrases carboniques II et III (CAII et CAIII) ont été ainsi étudiés par western blot. Une description précise du protocole expérimental utilisé pour chaque protéine est présentée en annexe.

# ARTICLE PRINCEPS

## INNOCUITE ET BENEFICES DE L'ENTRAINEMENT EN ENDURANCE CHEZ DES PATIENTS DREPANOCYTAIRES

*L'article « princeps » du projet « ExDre » est exposé dans ce manuscrit en amont de la partie « contribution personnelle », car au-delà des arguments d'innocuité, il présente également des résultats de l'étude témoignant des bénéfices de l'entraînement sur la base des différentes méthodes d'évaluation envisagées. Certains résultats relèvent de l'analyse des biopsies musculaires à ma charge. Cet article permet d'introduire les suivants concernant plus spécifiquement l'analyse des caractéristiques musculaires des patients drépanocytaires en réponse à l'entraînement en endurance.*

*Ainsi, cette étude a mis en évidence l'innocuité et la faisabilité du test incrémental sous-maximal et de l'entraînement en endurance chez ces patients drépanocytaires. Diverses adaptations fonctionnelles et tissulaires observées chez les patients entraînés et susceptibles d'entraîner une amélioration notable de leur qualité de vie ont été rapportées.*

---

### **ARTICLE ASSOCIÉ :**

Gellen B\*, Messonnier LA\*, Galactéros F, Audureau E, **Merlet AN**, Rupp T, Peyrot S, Martin C, Féasson L\*, Bartolucci P\*.

Moderate-intensity endurance-exercise training in sickle cell disease patients without severe chronic complications: an open label randomized controlled trial.

**The Lancet Haematol.** 2018.

---

## Introduction et objectif

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'innocuité, la faisabilité et les effets d'un programme d'entraînement en endurance de 8 semaines chez des patients drépanocytaires. L'hypothèse de cette étude randomisée, prospective et multicentrique était que ce programme d'entraînement réalisé à une intensité modérée et personnalisé à chaque patient pouvait être sans danger et également bénéfique à chacun d'eux.

## Méthodes

Quarante patients drépanocytaires homozygotes ont été inclus dans cette étude. Lors de l'inclusion, les patients présentaient des caractéristiques biologiques, pulmonaires, cardiaques et musculaires similaires. Ces patients étaient randomisés en 2 groupes : le groupe de patients entraînés a suivi un programme d'entraînement en endurance (personnalisé, d'intensité modérée et contrôlée) alors que les patients du groupe contrôle maintenaient leur mode de vie habituel. L'activité physique adaptée consistait en un exercice de pédalage de 40 minutes sur ergocycle, à raison de 3 sessions par semaine, pendant 8 semaines. L'intensité individuelle de pédalage était déterminée par un exercice incrémental sous maximal préalable et correspondait à la puissance développée pour une lactatémie d'environ 2,5 mmol/L, à peine au-dessus de l'intensité du premier seuil lactique. Lors de ce test incrémental, le critère principal de l'étude était mesuré et correspondait à la puissance de pédalage développée à 4 mmol/L de concentration lactique sanguine. Une biopsie du muscle *vastus lateralis* et des questionnaires sur la qualité de vie étaient également réalisés avant et après la période de traitement (voir partie matériels et méthodes).

## Résultats et discussion

Parmi les 40 patients inclus, 15 patients entraînés et 18 patients contrôles ont terminé l'étude et leurs données ont été analysées (3 exclus, 2 perdus de vue, 2 ont retiré leurs consentements).

Les patients entraînés ont amélioré leurs puissances à 4 mmol/L (+12%,  $P < 0,05$ ) et au premier seuil lactique (+45%,  $P < 0,001$ ) par rapport au groupe contrôle. Ces résultats sont associés à une augmentation de la consommation d'oxygène au premier seuil lactique (+33%,  $P < 0,001$ ) chez ces patients entraînés. Ces résultats témoignent de l'amélioration de la capacité fonctionnelle des patients. De plus, les concentrations sanguines de lactate mesurées lors du test incrémental sous-maximal après l'entraînement (à 40 W pour les femmes et 60 W pour les hommes) sont plus faibles (-18%,  $P < 0,01$ ), ce qui signifie que pour un même niveau d'exercice sous-maximal, l'accumulation de lactate est moindre. Cette constatation peut refléter l'amélioration des capacités d'oxydation musculaire induite par l'entraînement entraînant ainsi une diminution de la production et/ou de l'élimination du lactate.

Les résultats concernant l'analyse des biopsies musculaires révèlent une augmentation de la surface de section pour 100 fibres (+5%,  $P < 0,05$ ), de la densité capillaire (+17%,  $P < 0,01$ ), et une amélioration significative de 2 enzymes clés du métabolisme oxydatif musculaire [citrate synthase (CS) : +28%,  $P < 0,001$  et cytochrome c oxidase (COx) pour les fibres musculaires de type I : +11%,  $P < 0,05$ ] en réponse à l'entraînement. Ces résultats mettent en évidence que ce type d'entraînement permet d'inverser en partie les anomalies structurales, microvasculaires et métaboliques préalablement observées chez des patients drépanocytaires (Ravelojaona et al. 2015).

Egalement, le questionnaire de qualité de vie (SF-36) rapporte une amélioration de la vitalité et du bien-être émotionnel pour le groupe entraîné (+11%,  $P < 0,05$ ). Il est également intéressant d'observer qu'aucun patient du groupe entraîné n'a été hospitalisé alors que 5 patients du groupe contrôle ont dû l'être ( $P < 0,05$ ), principalement en raison de la survenue de crises vaso-occlusives. Ce résultat suppose l'effet potentiellement protecteur de ce mode d'entraînement sur le déclenchement de crises vaso-occlusives. Cependant, cette hypothèse nécessite d'être vérifiée sur une période d'entraînement plus longue.

## **Conclusion**

Cet entraînement en endurance, contrôlé et adapté, a montré son innocuité pour les patients drépanocytaires. Ce type d'entraînement améliore leurs capacités fonctionnelles (en particulier pour des intensités d'exercice proches de celles requises dans la vie quotidienne), adapte leurs tissus musculaires, mais aussi améliore leur qualité de vie. Ces résultats soutiennent l'intérêt de ce type d'activité physique adaptée comme nouvelle stratégie thérapeutique pour les patients drépanocytaires.



# Moderate-intensity endurance-exercise training in patients with sickle-cell disease without severe chronic complications (EXDRE) [A:OK?]: an open-label randomised controlled trial



Barnabas Gellen\*, Laurent A Messonnier\*, Frédéric Galactéros, Etienne Audureau, Angèle N Merlet, Thomas Rupp, Sandrine Peyrot, Cyril Martin, Léonard Féasson\*, Pablo Bartolucci\*, on behalf of the EXDRE collaborative study group†

## Summary

**Background** Exercise could be a triggering factor for vaso-occlusive crises in patients with sickle-cell disease. We aimed to investigate whether a patient-adapted training programme of moderate endurance exercise could be safe and beneficial for patients with sickle-cell disease.

**Methods** We did a multicentre, prospective, open-label, randomised controlled trial at four university hospitals in France. Eligible patients were older than 18 years, with an HbSS or S/β<sup>0</sup>-thalassaemia genotype, and with no severe chronic complications. All patients underwent cardiopulmonary exercise tests (CPETs) on a stationary bicycle with cardiac, pulmonary, laboratory, and muscle parameter evaluations at the start and end of the study period. We randomly assigned patients (1:1) to the training group (three 45-min exercise sessions per week, for 8 weeks) or the control group (no lifestyle changes) using a central computer-generated randomisation list. During baseline evaluation, patients and researchers were masked to group assignment; randomisation was done after completion of the baseline evaluation to minimise bias. The primary outcome was difference in power output at a blood lactate concentration of 4 mmol/L during CPET between baseline and the end of the 8-week training period. Patients were analysed on a per-protocol basis, excluding those who missed more than 20% of the training sessions or had other major protocol violations. This trial is registered with ClinicalTrials.gov, number NCT02571088, and is completed.

**Findings** Between Sept 8, 2014, and Dec 11, 2015, 40 patients were enrolled (20 to each group). After exclusion of seven patients (one pregnancy, one appendicitis, one protocol violation, two lost to follow-up, and two incompatibilities with work schedule), 33 patients were analysed (15 in the training group, 18 in the control group). At the 8-week follow-up, the absolute change from baseline in mean power output at 4 mmol/L blood lactate was 7·2 W (SD 8·7) in trained patients (from 70·4 W [SD 16·2] at baseline to 77·6 W [15·1] at end of intervention) compared with -0·1 W [A: -0·3 W, according to highlighted data? Please clarify] (9·4) in controls (from 66·2 W [13·8] to 65·9 W [15·6]; mean difference between groups 7·3 W [95% CI 0·7–13·8], p=0·031). No adverse events requiring hospital admission occurred in the training group, whereas five occurred in the control group: four (20%) vaso-occlusive crises (one complicated by an acute chest syndrome), and one (6%) viral infection with isolated chest pain (hazard ratio 0·143 [95% CI 0·024–0·827; p=0·029]).

**Interpretation** Moderate-intensity endurance-exercise training seems to be safe for adults with sickle-cell disease without severe chronic complications and significantly improved their functional capacity, especially for exercise levels close to those needed for daily activities. Our findings support consideration of endurance-exercise training as a novel therapeutic strategy for patients with sickle-cell disease.

**Funding** Société Française de Cardiologie and Institut National du Sport, de l'Expertise et de la Performance (INSEP).

Copyright © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Homozygous sickle-cell disease, the most common genetic disease worldwide, is caused by the β<sup>s</sup>-globin mutation on the *HBB* gene and is characterised by chronic haemolytic anaemia,<sup>1,2</sup> recurrent vaso-occlusive crises, and multiorgan damage.<sup>3–6</sup> Fatigue and poor physical capacity are common in patients with sickle-cell disease, as a result of anaemia and multiple pulmonary,<sup>7</sup> cardiac,<sup>4</sup> endothelial,<sup>2</sup> muscle, and metabolic<sup>8</sup> dysfunctions.<sup>9–13</sup> Moreover, patients have abnormal exercise-related physiological adaptations (eg, disproportionately increased pulmonary arterial pressure),<sup>14,15</sup> left ventricular diastolic dysfunction,<sup>6</sup> arterial

oxygen desaturation,<sup>16</sup> decreased peripheral oxygen uptake,<sup>11</sup> muscle weakness,<sup>17</sup> and abnormal blood lactate accumulation.<sup>18</sup> Importantly, abnormal lactate accumulation in blood is accompanied by acidosis,<sup>19</sup> which, in turn, might promote haemoglobin S polymerisation<sup>20</sup> and increase the risk of vaso-occlusive crisis. Because strenuous exercise can trigger vaso-occlusive crises,<sup>21–23</sup> patients with sickle-cell disease are usually advised to avoid physical activity, thereby adopting a sedentary lifestyle. This approach can lead to deconditioning, which in turn aggravates exercise intolerance, resulting in a hyper-sedentary lifestyle and worsened quality of life.

Lancet Haematol 2018;  
5: e555-63

See Comment page e502

\*Contributed equally

†Members of the EXDRE collaborative study group are listed in the appendix (p 8)

ELSAN-Polyclinique de Poitiers, Poitiers, France (B Gellen MD); Department of Cardiac Rehabilitation, (B Gellen, S Peyrot MD), Institut Mondor de Recherche Biomédicale (Prof F Galactéros MD), Sickle-Cell Referral Center, Department of Internal Medicine (Prof F Galactéros, Prof Bartolucci MD), and Department of Public Health (Prof E Audureau MD, Prof P Bartolucci), Henri-Mondor University Hospital-UPEC/Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Créteil, France; University Savoie Mont-Blanc, Inter-University Laboratory of Human Movement Sciences EA7424, Chambéry, France (Prof LA Messonnier PhD, T Rupp PhD); Inter-University Laboratory of Human Movement Sciences, EA7424, UJM-Saint-Etienne, University Lyon, Saint-Etienne, France (A N Merlet MSc, Prof L Féasson MD); Inter-University Laboratory of Human Movement Sciences, EA7424, Villeurbanne UCBL-Lyon 1, University Lyon, Villeurbanne, France (C Martin PhD); and Myology Unit, Referent Center of Rare Neuromuscular Diseases, Euro-NMD, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France (Prof L Féasson MD)

Correspondence to: Professor Pablo Bartolucci, Centre de Référence des Syndromes Drépanocytaires Majeurs, Hôpital Universitaire Henri Mondor, F-94000 Créteil, France  
pablo.bartolucci@aphp.fr

See Online for appendix



**Research in context****Evidence before this study**

Before completion of the protocol, we searched ClinicalTrials.gov using the search terms "sickle cell" (condition field) and "exercise" or "exercise training" combined with "sickle cell" (intervention/treatment field) for any unpublished randomised controlled trials done in patients with sickle-cell disease. Similar searches were done in the PubMed database for any published studies. We applied no date restrictions to our literature search. Searches were done in 2013 when the study protocol was planned and written, and were updated in May, 2014. We found no registered or reported randomised controlled trial involving an exercise-training intervention in patients with sickle-cell disease. Although a recent study suggested the feasibility and safety of a home-based exercise training schedule in children with sickle-cell disease, this study was neither controlled nor randomised. Additionally, the maximal cardiopulmonary exercise testing level used in this study might not be applicable to adult patients with sickle-cell disease.

**Added value of this study**

To the best of our knowledge, this trial is the first to investigate the effects of a moderate-intensity endurance-exercise training programme in adult patients with sickle-cell disease. Although these results are based on a small cohort of patients, they show

that this type of exercise training appears to be safe and beneficial. Training significantly improved the functional capacity of patients, especially at exercise intensities close to those needed for daily activities, and partly reversed structural, microvascular, and metabolic skeletal muscle abnormalities. Moreover, improved muscle function and tissue adaptations translated into significant improvements in two quality-of-life dimensions: physical activity and emotional wellbeing, although other quality-of-life dimensions or 6-min walk test distance were not improved.

**Implications of all the available evidence**

Our findings indicate that exercise capacity assessments and adapted physical activity modalities can be safely done by patients with sickle-cell disease, yielding meaningful functional benefits. If these exercise modalities are successfully assessed in a larger and more diverse sample of patients, physicians could apply this training programme in eligible and motivated patients with sickle-cell disease. Exercise modalities should also be included in educational programmes. The findings of our trial indicate that moderate-intensity endurance-exercise training appears to be a promising therapeutic option for patients with sickle-cell disease. Future studies are required to further understand the effects of training on the muscle tissue of these patients.

Many chronic diseases are characterised by limited functional capacity (eg, heart failure<sup>24</sup> or pulmonary diseases),<sup>25</sup> for which physical exercise was historically discouraged [A: ok?] for several decades. However, over time, exercise training has become a cornerstone of clinical management and treatment of such pathologies.<sup>24,25</sup> This paradigm shift was supported by studies exploring safety issues and appropriate training modalities for each disease. For sickle-cell disease, this change was initiated by preliminary studies in humans examining the feasibility, safety,<sup>26,27</sup> and benefits of repeated moderate-intensity exercise.<sup>28-30</sup> However, to our knowledge, no randomised controlled trial has been done until now.

The fundamental challenge of physical exercise for patients with sickle-cell disease remains prevention of exercise-induced vaso-occlusive crises, caused by hyperthermia, dehydration, and lactic acidosis. However, because moderate-intensity exercise avoids blood lactate accumulation, and because a facility-based indoor training programme allows environmental temperature control, adequate fluid intake, and measurement of blood lactate concentrations, a safe and potentially beneficial training programme of moderate-intensity endurance exercise (henceforth referred to as training) appears conceivable for patients with sickle-cell disease.

We aimed to examine the safety and efficacy of individually tailored training for patients with sickle-cell disease.

**Methods****Study design and patients**

This multicentre, open-label, randomised controlled trial was done at four university hospitals participating in the Sickle Cell Disease Referral Center in Créteil, France. Eligible patients had to have a homozygous HbSS or HbS/β<sup>0</sup>-thalassaemia genotype, be older than 18 years, be regularly followed up in one of the four university hospitals participating in the Sickle Cell Disease Referral Center, and be clinically stable (>1 month after a vaso-occlusive crisis episode or acute event and >3 months after blood transfusion). All eligible consecutive patients at the study centres were invited to participate in the study. None of the eligible patients initiated hydroxyurea treatment or hydroxyurea dose modification less than 1 month before enrolment or during the study. Exclusion criteria included pregnancy, heart disease, pulmonary hypertension, and cerebral vasculopathy, as detailed in the appendix. All patients provided written informed consent. The trial protocol was supervised by a data safety monitoring board and the trial was approved by the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Est 1 2014-14; EudraCT ID RCB 2014-A00334-43).

**Randomisation and masking**

We randomly assigned patients (1:1) to either the training or the control group using a central computer-generated

randomisation list with randomly permuted blocks of variable sizes using SAS 9.3. Patients and researchers were masked to group assignment during baseline evaluation; randomisation was done after completion of the baseline evaluation to limit bias. Individuals in the training group received the exercise intervention three times each week for 8 weeks; those in the control group underwent no lifestyle changes. Patients in the control group were instructed to maintain their average physical activity level without starting a new physical activity or increasing the intensity of a physical activity that they already did.

### Procedures

Stationary bicycles (ergoline GmbH; Bitz, Germany) with power output sensors were used for both assessment and the exercise intervention. All patients underwent the same cardiopulmonary exercise tests (CPETs) with cardiac, pulmonary, laboratory, and muscle parameter evaluations at the start and end of the study period. All assessments to assess the efficacy of the study intervention were done during five visits, before and after the 8-week training period, with at least 48 h of recovery between each visit. Patients did different tests at each of the five visits, including CPETs, the 6-min walk test, measure of the force of the quadriceps (not reported here), muscle biopsy, exercise transthoracic echocardiography (not reported here), tissue oxygenation measurements by near infrared spectroscopy (not reported here), and questionnaires. Full details of the CPET procedures are provided in the appendix (p 1); briefly, patients started CPET at a power output of 20 Watt (W; for women) or 30 W (for men), increasing every 2 min by 10 W or 15 W, respectively, with earlobe blood lactate concentrations measured at rest and every minute during exercise to establish a blood lactate curve for each patient. Exercise was stopped as soon as the blood lactate concentration reached 4 mmol/L or greater. Blood pressure, pulse oximetry (peripheral oxygen saturation), rating of perceived exertion, 12-lead electrocardiogram, heart rate, gas exchange, respiratory frequency, tidal volume, and pulmonary ventilation were recorded.

Patients in the training group received three 45-min exercise sessions per week, for 8 weeks. All patients were interviewed by the training supervisor before each session to assess physical wellbeing (feeling of fatigue) and vaso-occlusive crisis symptoms. Controls maintained their usual behaviours and were tested before and after the 8-week intervention period.

Individualised target power outputs for each session (in Watts [W]) were set based on blood lactate concentrations at the initial CPET or previous exercise session (corresponding to power output at a blood lactate concentration of approximately 2.5 mmol/L). Each session started with a 5-min warm-up on the stationary bicycle, including 3 min at 70% of the target power output, followed by a 2-min ramp exercise where the

power output increased progressively from 70% to 100%, where it was then maintained for 30 min, with a cycling frequency of 60 rotations per min. Blood pressure, transcutaneous peripheral oxygen saturation, and blood lactate concentration were measured, and self-perceived exertion rated during each session. Sessions ended with a 5-min active cool-down period, with a continuous decrease in power output from 100% to 70% over 2 min, followed by 3 min of cycling at 70%. Where necessary (eg, because of fatigue, physical discomfort, or excessive increase in blood lactate concentration), the target power output was adjusted during the session. The patient's blood lactate concentration measured at the end of the session determined their target power output in the next session. Full details about the protocol for training and power output adjustment are available in the appendix (p 1).

### Outcomes

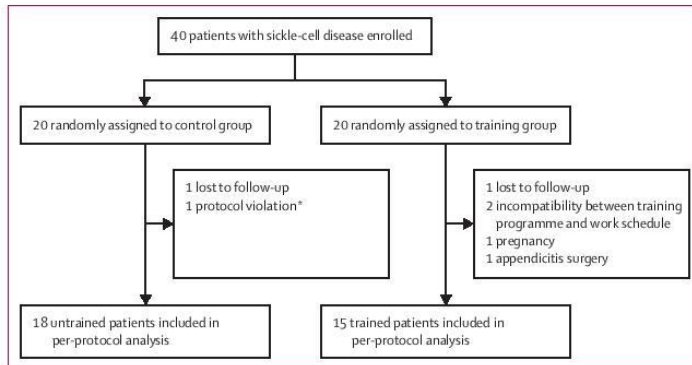
The primary outcome was the change from baseline to the end of the 8-week intervention period in power output at 4 mmol/L blood lactate concentration during submaximal CPET. Power output at 4 mmol/L blood lactate concentration corresponds to submaximal exercise intensity just before potentially harmful acidosis occurs and has been shown to reflect physical fitness in the general population.<sup>31</sup>

The main secondary endpoint was the power output at the first lactate threshold during submaximal CPET, which indicates the transition from moderate to intense exercise. Power output at the first lactate threshold constitutes a good marker of the physical capacities required for patients' daily activities. In patients with sickle-cell disease, the first lactate threshold occurs at very low exercise intensity and oxygen uptake,<sup>9,17,32</sup> corresponding to walking at 3.5–4.5 km/h.

Other secondary endpoints were changes in blood lactate concentration at 40 W for women and 60 W for men during submaximal CPET, blood and urine parameters, pulmonary function tests, distance walked during the 6-min walk test, transthoracic echocardiography parameters, patient-reported outcomes including generic health-related quality of life (SF-36<sup>33</sup>) and physical self-concept evaluations (Physical Self-Description Questionnaire [PSDQ]<sup>34</sup>), and muscle microvascular, energy, and structural characteristics (histological and biochemical analyses of vastus lateralis muscle biopsy samples taken from all patients at the baseline evaluation and in all patients who completed the follow-up evaluation).

Patients self-evaluated pain and fatigue daily with a visual analogue scale (0–100). Adverse events and causes and duration of hospital admissions were reported by patients to the medical team of the Sickle Cell Disease Center. Patients in the training group with a potentially increased risk of adverse events were interviewed by training physicians before each training session. Major





**Figure 1: Trial profile**  
\*Uncontrolled home-based exercise.

adverse events related to sickle-cell disease were defined as vaso-occlusive crisis or acute thoracic syndrome, or both, requiring hospital admission. Minor adverse events were defined as vaso-occlusive crisis not requiring hospital admission (painful episode in one or more osteoarticular regions not explained by causes other than sickle-cell disease). Severe vaso-occlusive crisis was defined as pain or sensitivity affecting at least one part of the body and not attributable to other causes requiring a visit to the emergency department or admission to hospital. Acute chest syndrome was defined as the combination of two criteria among chest pain, radiological infiltrate, and auscultatory abnormality.

**Statistical analysis**

Descriptive results are expressed as mean (SD) or median (IQR) for continuous variables, and as numbers (%) for categorical variables. For unadjusted between-group comparisons of continuous variables (including the primary endpoint) we used *t* tests or Mann-Whitney tests, depending on the normality of the distributions, as assessed by the Shapiro-Wilk test for normality, and kurtosis and skewness indicators. Mean difference in absolute mean changes from baseline between randomised groups was computed for the primary endpoint along with its 95% CI. Within-group comparisons of continuous variables were done to test the statistical significance of the changes from baseline separately within each randomised group, with paired *t* tests or Wilcoxon signed rank tests, as appropriate. Categorical variables were compared with the  $\chi^2$  or Fisher's exact test, as appropriate.

Sample size calculation relied on published data about the exercise capacity of patients with sickle-cell disease and preliminary uncontrolled results about the efficacy of the training programme (appendix p 1). At a two-sided type 1 error of 5%, a sample size of 32 patients (16 per group) was required to provide 90% power to detect a mean difference of 25 W (SD 21.5) in favour of the training

group, representing a relative increase of 35% in the primary outcome from baseline to the 8-week follow-up. Enrolment of 40 patients (20 in each group) was planned, assuming that 20% of patients would discontinue the study. Additional details are available in the appendix (p 1).

Patients were assessed on a per-protocol basis according to randomised treatment group, by excluding those lost to follow-up or with protocol deviations, or both: patients who were unable to complete 80% or more of the scheduled training sessions for medical, motivational, or professional reasons, or a combination of the above.

All tests were two-tailed and p values less than 0.05 defined as significant. Analyses were computed with Stata software, version 14.2.

This trial is registered with ClinicalTrials.gov, number NCT02571088.

**Role of the funding source**

The funders of the study had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or the writing of the report. The corresponding author had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

**Results**

Between Sept 8, 2014, and Dec 11, 2015, 40 adults with sickle-cell disease were enrolled and randomly assigned to the training and control groups (figure 1). 33 (83%) patients completed the study protocol requirements (15 in the training group, 18 in the control group) and were included in the per-protocol analysis. Seven patients were not analysed: five in the training group and two in the control group (figure 1).

Patients' baseline characteristics were broadly similar between groups (table 1; appendix p 3). The 15 trained patients participated in an average of 21.6 (SD 2.0) sessions. Their mean resting blood lactate concentration at baseline was 1.6 mmol/L (SD 0.5) and mean oxygen saturation was 96.7% (1.9).

At 8 weeks of follow-up, mean power output at 4 mmol/L blood lactate concentration was improved for trained patients (from 70.4 W [SD 16.2] to 77.6 W [15.1]) but not for controls (from 66.2 W [13.8] to 65.9 W [15.6]); their respective absolute mean changes from baseline were 7.2 W (SD 8.7) versus -0.1 W [A: should this be -0.3 W; ie, from 66.2 to 65.9?] (9.4; mean difference between groups 7.3 W [95% CI 0.7-13.8], p=0.031; table 2, figure 2A).

Trained patients significantly improved their power output at their [A: addition ok?] first lactate threshold (from 38.5 W [SD 10.8] to 54.8 W [14.4]), compared with controls (from 39.7 W [13.2] to 39.2 W [10.8], p<0.0001; table 2, figure 2B). Oxygen uptake at the first lactate threshold increased by 32.6% (relative change) in the training group but remained unchanged [A: data not shown?] in the control group (p=0.0001). At a given CPET power output (40 W for women,

	All patients (n=33)	Untrained patients (n=18)	Trained patients (n=15)	p value
<b>Demographic characteristics</b>				
Age, years	34.1 (9.9)	33.6 (9.0)	34.7 (11.1)	0.738
Men	18 (54%)	10 (56%)	8 (53%)	0.898
Women	15 (46%)	8 (44%)	7 (47%)	..
Body-mass index, kg/m <sup>2</sup>	22.0 (2.9)	22.2 (3.0)	21.8 (2.9)	0.682
Previous vaso-occlusive crisis	19 (58%)	12 (67%)	7 (47%)	0.242
Previous acute chest syndrome	20 (61%)	12 (67%)	8 (53%)	0.435
Hydroxyurea	15 (46%)	6 (33%)	9 (60%)	0.126
<b>Laboratory assessments</b>				
Haemoglobin, g/dL	9.2 (8.3-9.7)	9.2 (8.2-9.7)	9.3 (8.6-10.4)	0.677
Leucocytes, × 10 <sup>6</sup> /L	9.0 (7.4-11.3)	10.7 (8.2-11.7)	7.5 (7.0-10.8)	0.070
Platelets, × 10 <sup>9</sup> /L	333.0 (274.0-449.0)	326.5 (271.0-449.0)	349.0 (304.0-481.0)	0.745
Blood urea nitrogen, mmol/L	2.8 (2.4-3.6)	3.0 (2.3-3.6)	2.7 (2.4-3.1)	0.677
Creatinine, mg/dL	58.0 (49.0-69.0)	59.0 (48.0-69.0)	58.0 (51.0-69.0)	0.800
Lactate dehydrogenase, IU/L	377.0 (294.0-442.0)	413.0 (275.0-487.0)	376.0 (298.0-441.0)	0.704
Total bilirubin, mg/dL	36.0 (24.0-54.5)	36.0 (29.0-58.0)	30.0 (22.0-53.0)	0.450
Workload at 4 mmol/L blood lactate, W	68.1 (14.8)	66.2 (13.8)	70.4 (16.2)	0.424
<b>Cardiopulmonary exercise tests at rest</b>				
Systolic blood pressure, mm Hg	114.8 (14.0)	113.3 (12.9)	116.7 (15.4)	0.505
Diastolic blood pressure, mm Hg	72.7 (9.8)	72.2 (10.0)	73.3 (9.8)	0.751
Heart rate per min	85.5 (13.9)	85.8 (14.5)	85.2 (13.7)	0.899
Oxygen consumption, L/min	0.3 (0.1)	0.3 (0.1)	0.3 (0.1)	0.806
SpO <sub>2</sub> , %	96.7% (1.9)	96.5% (2.0)	97.0% (1.8)	0.478
Lactate, mmol/L	1.6 (0.5)	1.6 (0.4)	1.7 (0.6)	0.677
<b>At first lactate threshold</b>				
Workload, W	39.2 (12.0)	39.7 (13.2)	38.5 (10.8)	0.777
Heart rate per min	124.1 (17.7)	125.6 (21.9)	122.2 (11.3)	0.594
Oxygen consumption, L/min	0.7 (0.2)	0.7 (0.2)	0.7 (0.2)	0.771
SpO <sub>2</sub> , %	95.9% (2.2)	95.8% (2.2)	96.1% (2.4)	0.749
Lactate, mmol/L	2.0 (0.4)	2.0 (0.4)	2.0 (0.4)	0.872
<b>At 40 W (women) or 60 W (men)</b>				
Heart rate per min	134.5 (17.0)	137.2 (18.3)	131.3 (15.2)	0.331
Oxygen consumption, L/min	0.8 (0.2)	0.8 (0.2)	0.8 (0.2)	0.469
SpO <sub>2</sub> , %	96.4% (2.5)	95.9% (2.5)	96.9% (2.5)	0.294
Lactate, mmol/L	2.7 (0.7)	2.7 (0.7)	2.7 (0.8)	0.857
<b>Muscle parameters</b>				
Type I fibres, %	38.8% (14.6)	39.0% (15.7)	38.4% (13.8)	0.908
Capillary density, number per mm <sup>2</sup>	195.3 (32.0)	192.5 (30.7)	198.4 (34.2)	0.611
Cytochrome c oxidase 1, AU	113.3 (13.0)	113.9 (13.5)	112.6 (12.8)	0.788
Citrate synthase, mol/min/g dry weight	0.044 (0.014)	0.048 (0.015)	0.040 (0.012)	0.133
100-myocyte area, mm <sup>2</sup>	0.33 (0.09)	0.32 (0.09)	0.34 (0.09)	0.620

Data are n (%), mean (SD), or median (IQR). W=watts. SpO<sub>2</sub>=specific arterial oxygen saturation. [A: we wouldn't usually compare baseline characteristics in an RCT; can we remove the column showing p values?]

**Table 1: Baseline characteristics of untrained and trained patients with sickle-cell disease**

60 W for men), [A: mean?] blood lactate concentration 50 decreased significantly for the training group from 2.68 mmol/L [A: SD?] before training to 2.13 mmol/L [A: SD?] after training (p=0.010) but remained unchanged for controls (2.73 mmol/L [A: SD?] before vs 2.77 mmol/L [A: SD?] after training).

No significant between-group differences were found for changes from baseline in laboratory and echocardiographic

parameters, pulmonary function tests (apart from tidal volume), and 6-min walk test distance (appendix p 4).

With regard to muscle characteristics (figure 2C–G; table 2), capillary density increased by a relative change of 17% (p=0.003) in the training group but only increased by 3% in untrained controls. Activities of citrate synthase and cytochrome c oxidase 1 [A: I?], two key skeletal muscle enzymes involved in oxidative metabolism, rose



	Untrained patients (n=18)		Trained patients (n=15)		p value	
	Absolute change	Relative change	Absolute change	Relative change	Absolute change	Relative change
Workload at 4 mmol/L blood lactate, W (primary endpoint)	-0.1 (9.4)	0.6% (14.9)	7.2 (8.7)	11.7% (13.2)	0.031	0.034
Cardiopulmonary exercise test						
At rest						
Systolic blood pressure, mm Hg	-1.1 (16.0)	-0.8% (13.6)	-8.3 (14.4)	-6.3% (10.9)	0.185	0.213
Diastolic blood pressure, mm Hg	-4.4 (9.2)	-5.4% (12.6)	-6.7 (15.0)	-7.1% (19.3)	0.605	0.767
Heart rate per min	-3.2 (13.4)	-2.6% (15.1)	0.3 (14.0)	2.3% (18.4)	0.470	0.408
Oxygen consumption, L/min	0.01 (0.10)	9.6% (41.6)	-0.02 (0.09)	1.4% (40.2)	0.383	0.574
SpO <sub>2</sub> , %	-1.3 (1.9)	-1.3% (2.0)	-0.3 (2.3)	-0.3% (2.4)	0.301	0.296
Lactate, mmol/L	-0.1 (0.5)	-3.5% (30.0)	-0.1 (0.5)	-0.7% (30.7)	0.792	0.793
Workload at 2.5 mmol/L blood lactate, W	0.4 (9.3)	3.8% (26.2)	11.6 (9.3)	27.0% (27.0)	0.003	0.027
At first lactate threshold						
Workload, W	-0.6 (10.9)	3.2% (28.8)	16.3 (7.6)	44.6% (20.1)	<0.0001	0.0001
Heart rate per min	-4.0 (16.5)	-1.5% (13.1)	5.1 (12.2)	4.5% (9.9)	0.088	0.152
Oxygen consumption, L/min	-0.01 (0.10)	-1.0% (13.6)	0.21 (0.18)	32.6% (28.2)	0.0001	<0.0001
SpO <sub>2</sub> , %	0.3 (1.9)	0.3% (2.0)	0.7 (1.2)	0.8% (1.2)	0.525	0.530
Lactate, mmol/L	-0.1 (0.5)	-0.2% (23.6)	0.1 (0.5)	9.6% (24.5)	0.182	0.255
At 40 W (women) or 60 W (men)						
Heart rate per min	-2.9 (10.5)	-1.9% (7.3)	-7.3 (12.8)	-4.8% (9.1)	0.283	0.309
Oxygen consumption, L/min	0.00 (0.18)	0.8% (21.6)	0.04 (0.16)	6.7% (19.6)	0.453	0.428
SpO <sub>2</sub> , %	-0.9 (3.2)	-0.8% (3.3)	-0.5 (2.4)	-0.5% (2.5)	0.729	0.742
Lactate, mmol/L	0.0 (0.6)	4.2% (25.3)	-0.6 (0.6)	-18.4% (19.8)	0.010	0.009
Muscle parameters						
Type I fibres, %	-5.4 (12.2)	-8.2% (26.0)	-1.3 (8.7)	-2.7% (26.7)	0.290	0.557
Capillary density, number per mm <sup>2</sup>	4.6 (16.2)	2.6% (8.8)	3.45 (31.2)	17.3% (16.2)	0.002	0.003
Cytochrome c oxidase 1, AU	4.0 (8.2)	4.2% (8.2)	11.9 (12.6)	11.4% (11.6)	0.042	0.050
Citrate synthase, mol/min/g dry weight	-0.004 (0.013)	-4.6% (29.5)	0.012 (0.005)	32.3% (22.1)	<0.0001	<0.0001
100-myocyte area, mm <sup>2</sup>	-0.03 (0.07)	-8.3% (-18.8 to 4.0)*	0.02 (0.03)	5.4% (0.0 to 12.0)*	0.038	0.039

Data are mean (SD), unless otherwise indicated. \*Mean (range). W=watts. SpO<sub>2</sub>=specific oxygen saturation.

Table 2: Effects of endurance-exercise training, expressed as changes from baseline in cardiopulmonary exercise tests and muscle parameters

significantly for the training group but remained unchanged [A: looks like one increased slightly and the other decreased slightly in table 2; should we rephrase here?] for controls. Finally, the 100-myocyte area tended to increase in trained patients but tended to decrease slightly in controls, resulting in a significant between-group difference (p=0.039; figure 2H).

Analysis of patient-reported outcomes found evidence of significant absolute improvement in mental health (p=0.043) and relative improvement in vitality (p=0.043) subscales of SF-36, and in PSDQ physical activity-perception outcomes for trained patients (p=0.037), but no significant differences in other domains (appendix p 5).

Results from within-group comparisons to assess the statistical significance of changes from baseline separately within each randomised group are shown in the appendix (pp 6, 7), confirming the trends observed in between-group comparisons.

Trained patients had no major adverse events, but five untrained controls required admission to hospital (hazard ratio 0.143 [95% CI 0.024–0.827], p=0.029; figure 3); four for vaso-occlusive crisis, including one complicated by an acute chest syndrome requiring a short stay at the intensive care unit; and the fifth patient had a viral infection with isolated chest pain. No significant between-group difference was found for change in self-reported daily pain and fatigue (appendix p 5).

### Discussion

The results of this randomised controlled trial on endurance-exercise training for patients with sickle-cell disease show that these patients can benefit from an individually tailored and supervised exercise training programme, without heightened risk of vaso-occlusive crisis. The moderate-intensity training improved physical capacities and muscle characteristics, and had a positive effect on some aspects of quality of life.

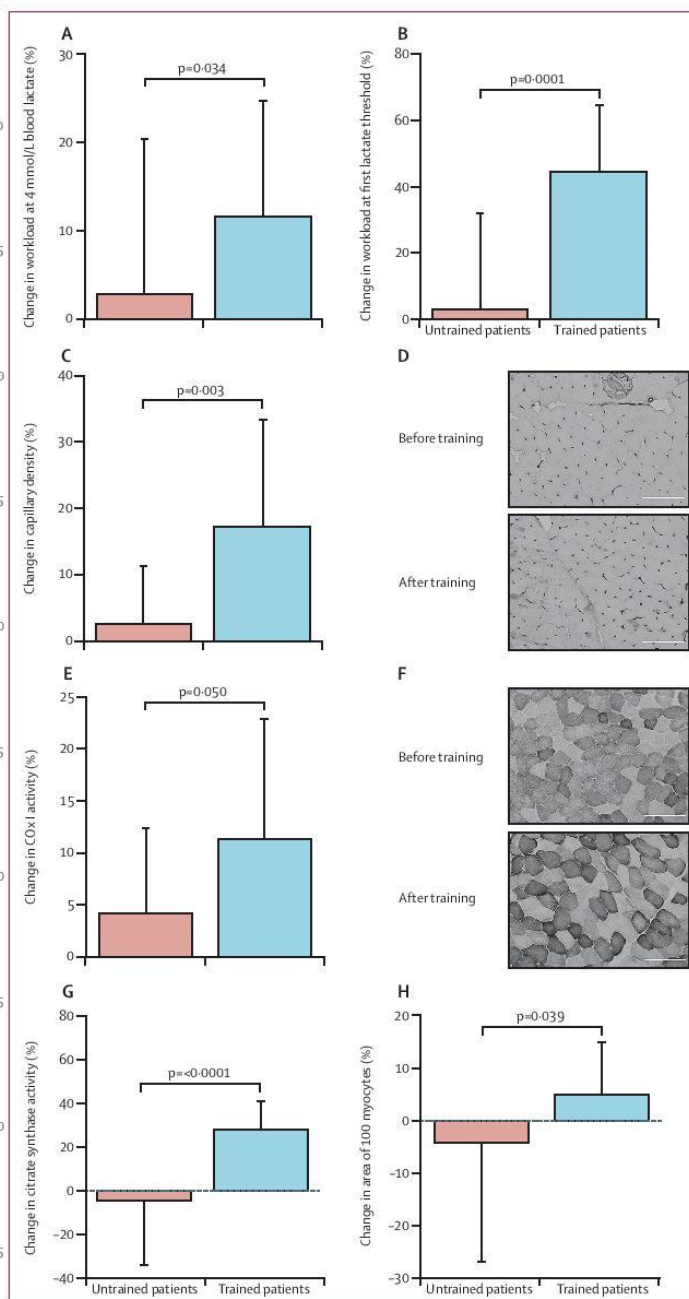
Although training has proven beneficial in mice with sickle-cell disease,<sup>35–37</sup> scarce data are available for patients. In France, patient advocacy groups have asked physicians and researchers to conduct a pilot exercise-training study to provide new insights about exercise in sickle-cell disease. Several case reports<sup>27,30</sup> and one uncontrolled pilot study done in ten adults<sup>38</sup> suggested that patients' physical capacities could be improved by respiratory muscle training, physiotherapy, or aquatic rehabilitation. Liem and colleagues<sup>26</sup> proposed a home-based 12-week training programme for children and showed the feasibility of this intervention. The remaining challenge was to design a training programme sufficiently intense to improve physical capacity and muscle characteristics, while limiting acidosis and the risk of vaso-occlusive crisis. A dynamic measurement of blood lactate concentration during endurance exercise of approximately 2.5 mmol/L, a common target intensity used for endurance training,<sup>39</sup> might meet these requirements.

Indeed, the improvement in the primary outcome (power output at 4 mmol/L blood lactate concentration) in the training group indicates that training can enhance functional capacity in patients with sickle-cell disease.<sup>31</sup> At enrolment, the first lactate threshold was reached at a low power output (approximately 30–40 W), which was largely below the values observed in conditions such as chronic heart failure<sup>40</sup> and underscores the profoundly impaired functional capacities of patients with sickle-cell disease. Their markedly diminished physical capacity explains why most of these patients perceive basic daily activities as exceedingly difficult. The trainees' substantial increase in power output at the first lactate threshold is indicative of meaningful improvements in functional capacity corresponding to the exercise levels needed for daily activities.<sup>41</sup>

Another way to quantify the beneficial effects of training is to compare blood lactate concentrations at a given power output, before and after training. The decreased blood lactate concentrations measured after training (at 40 W for women and 60 W for men) during CPET clearly showed that the same submaximal exercise level induced less lactate accumulation after training. This finding might reflect training-induced improvements in muscle oxidative capacities leading to decreased lactate production, more efficient lactate removal, or both.

**Figure 2:** Effects of endurance-exercise training (mean percentage [A: absolute or relative?] change) on muscle function and characteristics in patients who received training compared with untrained controls. Trained (n=15) and control (n=18) patients' power outputs at 4 mmol/L blood lactate (A) and first lactate threshold (B), defined as the first inflection point (acceleration) of blood lactate accumulation during submaximal cardiopulmonary exercise tests. Percentage change in capillary density (C) and histology (D); percentage change in cytochrome oxidase type I (COx I) oxidative activity in muscle fibres (E) and histology (F); change in citrate synthase activity (G); and change in 100-myocyte area (H). Values are expressed as percentages of values measured before training. Scale bar 200  $\mu$ m.

The skeletal muscle abnormalities observed at enrolment agree with previous observations,<sup>8</sup> highlighting the fundamental involvement of skeletal muscle in sickle-cell disease pathophysiology. Our results suggest





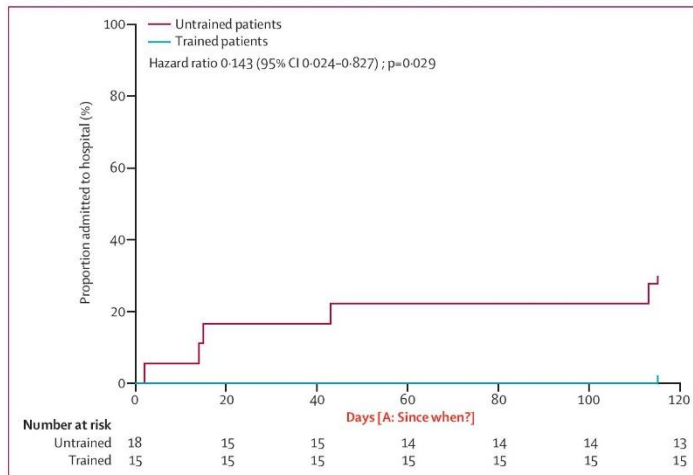


Figure 3: Hospital admissions during the study period for trained and untrained patients with sickle-cell disease

that training was able to partly reverse these functional, histological, and metabolic abnormalities. First, the increased capillary density facilitates improved oxygen supply to skeletal muscle cells. Second, upregulation of key enzymes involved in aerobic muscle metabolism indicates improved oxygen uptake and utilisation by skeletal muscle fibres. Third, the amyotrophy commonly observed in patients with sickle-cell disease was found to be mildly alleviated in trainees compared with controls, as represented by the significant between-group difference in 100-myocyte area.

Finally, our examination of whether or not increased functional capacities translated into improved quality of life for trained patients with sickle-cell disease showed that these patients perceived themselves to be less tired and felt more vigorous, calm, happy, and peaceful after training [A: where are these data in the Results? Please add as all data discussed here must be cited on first mention in the Results section]. The relatively short duration of the training programme did not enable us to show significant improvements in other quality-of-life scale dimensions.

Our study protocol accorded fundamental importance to safety, as assessed by meticulous tracking of all adverse events. Special attention was given to factors that might precipitate vaso-occlusive crises during training sessions, such as acidosis, dehydration, and exposure to low temperatures.<sup>22</sup> Randomisation assignments during the study period were similar for both groups, excluding the hypothesis of a weather bias. All major adverse events occurred in untrained controls. However, the small sample size and short duration of the training programme hamper a convincing demonstration of the protective effect of exercise against adverse events, particularly vaso-occlusive crisis.

Major limitations of the study are the small sample size, the 25% dropout rate in the training group, the short duration of the training period, and the absence of evaluation of sustained lifestyle changes in trained patients after completion of the study. Furthermore, because of the exclusion of patients who had sickle-cell disease with hip joint pathologies, the present cohort is not entirely representative of an all-comers population of adults with sickle-cell disease. The sample size in this pilot study was driven by ethical considerations because of the invasive aspect of the protocol (muscle biopsy samples) and the organisational constraints associated with arranging almost 40 hospital visits for patients randomly assigned to the training group. Because of the small sample size and the large anticipated dropout rate, the study was not sufficiently powered for stratification (eg, on hydroxyurea treatment), to convincingly show improvements in quality of life, to show the protective effect of exercise training against adverse events such as vaso-occlusive crisis, or to detect possible improvements in the 6-min walk test walking distance. The use of the per-protocol analysis plan, with more dropouts in the training group than in the control group, could have introduced bias with regard to randomisation. This bias seems negligible, however, since the 15 trained and 18 untrained patients in the per-protocol analysis remained similar in terms of baseline characteristics.

Our results indicate that standardised, supervised, and patient-adapted moderate-intensity endurance-exercise training can be safe for patients with homozygous sickle-cell disease without chronic complications, leading to improved functional capacity, especially for exercise intensities close to those required in daily life. These changes were associated with improvements in skeletal muscle characteristics and some domains of patients' self-reported quality of life. Our results support consideration of training as a novel therapeutic strategy for patients with sickle-cell disease. Further studies are needed to explore the long-term effects of physical activity sustained beyond 3 months, especially its potential to prevent vaso-occlusive crises.

**Contributors**

BG, LAM, LF, and PB contributed equally to each step of the study: to the literature search, study design, data collection, data analysis and interpretation, writing of the manuscript, and manuscript revision. FG contributed to the literature search, study design, data interpretation, and writing of the manuscript. EA contributed to data analysis, data interpretation, writing of the manuscript (including the conception of tables 1 and 2), and manuscript revision. ANM contributed to data collection, data analysis, data interpretation, and writing and revision of the manuscript. TR contributed to the literature search, study design, data collection, and data interpretation. SP contributed to data collection, data interpretation, and manuscript revision. CM contributed to the literature search, study design, data interpretation, manuscript writing, and manuscript revision.

**Declaration of interests**

We declare no competing interests.

**Data sharing**

Individual participant data that underlie the results reported in this Article, after de-identification (text, tables, figures, and appendices), will be available, along with the study protocol, statistical analysis plan,



and informed consent form immediately following publication and up to 5 years after publication. Data will be shared with researchers who provide a methodologically sound proposal. Proposals should be directed to the corresponding author. To gain access, data requesters will need to sign a data access agreement.

#### Acknowledgments

This study was funded by Société Française de Cardiologie and Institut National du Sport, de l'Expertise et de la Performance (INSEP) and supported by the University Hospital of Saint-Etienne, France. [A: ok as edited? If not, please clarify the role of the University Hospital of Saint-Etienne.] We thank Janet Jacobson for editorial assistance.

#### References

- Ware RE, de Montalembert M, Tshililo L, Abboud MR. Sickle cell disease. *Lancet* 2017; **390**: 311–23.
- Sety BN, Stuart MJ. Vascular cell adhesion molecule-1 is involved in mediating hypoxia-induced sickle red blood cell adherence to endothelium: potential role in sickle cell disease. *Blood* 1996; **88**: 2311–20.
- Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* 2010; **376**: 2018–31.
- Damy T, Bodez D, Habibi A, et al. Haematological determinants of cardiac involvement in adults with sickle cell disease. *Eur Heart J* 2016; **37**: 1158–67.
- Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet* 2004; **364**: 1343–60.
- Sachdev V, Kato GJ, Gibbs JS, et al. Echocardiographic markers of elevated pulmonary pressure and left ventricular diastolic dysfunction are associated with exercise intolerance in adults and adolescents with homozygous sickle cell anemia in the United States and United Kingdom. *Circulation* 2011; **124**: 1452–60.
- Gladwin MT, Barst RJ, Gibbs JS, et al. Risk factors for death in 632 patients with sickle cell disease in the United States and United Kingdom. *PLoS One* 2014; **9**: e99489.
- Ravelojoana M, Feasson L, Oyono-Enguelle S, et al. Evidence for a profound remodeling of skeletal muscle and its microvasculature in sickle cell anemia. *Am J Pathol* 2015; **185**: 1448–56.
- Anthi A, Machado RF, Jison ML, et al. Hemodynamic and functional assessment of patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; **175**: 1272–79.
- Chaudry RA, Bush A, Rosenthal M, Crowley S. The impact of sickle cell disease on exercise capacity in children. *Chest* 2013; **143**: 478–84.
- Liem RI, Reddy M, Pelligra SA, et al. Reduced fitness and abnormal cardiopulmonary responses to maximal exercise testing in children and young adults with sickle cell anemia. *Physiol Rep* 2015; **3**: e12338.
- Liem RI, Nevin MA, Prestridge A, Young LI, Thompson AA. Functional capacity in children and young adults with sickle cell disease undergoing evaluation for cardiopulmonary disease. *Am J Hematol* 2009; **84**: 645–49.
- Dedeken L, Chapuisette R, Le PQ, et al. Reduction of the six-minute walk distance in children with sickle cell disease is correlated with silent infarct: results from a cross-sectional evaluation in a single center in Belgium. *PLoS One* 2014; **9**: e108922.
- de Lima-Filho NN, Figueiredo MS, Vicari P, et al. Exercise-induced abnormal increase of systolic pulmonary artery pressure in adult patients with sickle cell anemia: an exercise stress echocardiography study. *Echocardiography* 2016; **33**: 1880–90.
- Machado RF, Mack AK, Martyr S, et al. Severity of pulmonary hypertension during vaso-occlusive pain crisis and exercise in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol* 2007; **136**: 319–25.
- 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.
- Waltz X, Pichon A, Lemonne N, et al. Normal muscle oxygen consumption and fatigability in sickle cell patients despite reduced microvascular oxygenation and hemorheological abnormalities. *PLoS One* 2012; **7**: e52471.
- Moheeb H, Wali YA, El-Sayed MS. Physical fitness indices and anthropometrics profiles in schoolchildren with sickle cell trait/disease. *Am J Hematol* 2007; **82**: 91–97.
- Lindinger MI, Kowalchuk JM, Heigenhauser GJ. Applying physicochemical principles to skeletal muscle acid-base status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; **289**: R891–94; author reply R904–10.
- Lindinger MI, Heigenhauser GJ. Effects of gas exchange on acid-base balance. *Compr Physiol* 2012; **2**: 2203–54.
- Humphreys JV. The management of sickle cell disease in a primary care setting. *J Family Med Prim Care* 2012; **1**: 56–58.
- Bartolucci P, Habibi A, Khellaf M, et al. Score predicting acute chest syndrome during vaso-occlusive crises in adult sickle-cell disease patients. *EBioMedicine* 2016; **10**: 305–11.
- 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* 2018; **52**: 214–18.
- O'Connor CM, Whellan DJ, Lee KL, et al. Efficacy and safety of exercise training in patients with chronic heart failure: HF-ACTION randomized controlled trial. *JAMA* 2009; **301**: 1439–50.
- Gigliotti F, Coli C, Bianchi R, et al. Exercise training improves exertional dyspnea in patients with COPD: evidence of the role of mechanical factors. *Chest* 2003; **123**: 1794–802.
- Liem RI, Akinosun M, Muntz DS, Thompson AA. Feasibility and safety of home exercise training in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer* 2017; **64**: e26671.
- Camcioglu B, Bosnak-Guclu M, Karadalli MN, Aki SZ, Turkoz-Sucak G. The role of inspiratory muscle training in sickle cell anemia related pulmonary damage due to recurrent acute chest syndrome attacks. *Case Rep Hematol* 2015; **2015**: 780159.
- Barbeau P, Woods KF, Ramsey LT, et al. Exercise in sickle cell anemia: effect on inflammatory and vasoactive mediators. *Endothelium* 2001; **8**: 147–55.
- 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.
- Tinti G, Somera R Jr, Valente FM, Domingos CR. Benefits of kinesiotherapy and aquatic rehabilitation on sickle cell anemia. A case report. *Genet Mol Res* 2010; **9**: 360–64.
- Messonnier L, Freund H, Bourdin M, Belli A, Lacour JR. Lactate exchange and removal abilities in rowing performance. *Med Sci Sports Exerc* 1997; **29**: 396–401.
- Callahan LA, Woods KF, Mensah GA, Ramsey LT, Barbeau P, Gutin B. Cardiopulmonary responses to exercise in women with sickle cell anemia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; **165**: 1309–16.
- Ware JE Jr, Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Medical Care* 1992; **30**: 473–83.
- Marsh HW. Physical Self Description Questionnaire: stability and discriminant validity. *Res Q Exerc Sport* 1996; **67**: 249–64.
- Chatel B, Messonnier LA, Barge Q, et al. Endurance training reduces exercise-induced acidosis and improves muscle function in a mouse model of sickle cell disease. *Mol Genet Metab* 2017; **123**: 400–10.
- 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.
- Aufradet E, Douillard A, Charrin E, et al. Physical activity limits pulmonary endothelial activation in sickle cell SAD mice. *Blood* 2014; **123**: 2745–47.
- Zanoni CT, Galvao F, Cliquet Junior A, Saad ST. Pilot randomized controlled trial to evaluate the effect of aquatic and land physical therapy on musculoskeletal dysfunction of sickle cell disease patients. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015; **37**: 82–89.
- Messonnier L, Aranda-Berthouze SE, Bourdin M, Bredel Y, Lacour JR. Rowing performance and estimated training load. *Int J Sports Med* 2005; **26**: 376–82.
- Edelmann F, Gelbrich G, Dungen HD, et al. Exercise training improves exercise capacity and diastolic function in patients with heart failure with preserved ejection fraction: results of the Ex-DHF (Exercise training in Diastolic Heart Failure) pilot study. *J Am Coll Cardiol* 2011; **58**: 1780–91.
- Wasserman K. The anaerobic threshold measurement to evaluate exercise performance. *Am Rev Respir Dis* 1984; **129**: S35–40.

# **CONTRIBUTION PERSONNELLE**

# ÉTUDE 1

## ADAPTATIONS DU RESEAU MICROVASCULAIRE DU TISSU MUSCULAIRE DES PATIENTS DREPANOCYTAIRES EN REPONSE A L'ENTRAINEMENT EN ENDURANCE

*L'innocuité et les bénéfices fonctionnels ayant été démontrés dans l'article « princeps », l'objectif de cette étude était d'analyser les adaptations du réseau microvasculaire du tissu musculaire des patients drépanocytaires à la suite d'un entraînement en endurance.*

*Pour cette étude, les analyses ont été réalisées au sein du Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (LIBM) (Université Jean Monnet à Saint-Etienne et Université Savoie Mont Blanc à Chambéry) en collaboration avec l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Clermont-Theix.*

*Si les patients drépanocytaires présentent d'importants remodelages/altérations au niveau du réseau microvasculaire, l'entraînement en endurance a en partie réduit ces altérations grâce à la création de nouveaux microvaisseaux tout en conservant les particularités morphologiques (peu tortueux) de ceux-ci.*

---

### **ARTICLE ASSOCIÉ :**

**Merlet AN, Messonnier L, Coudy-Gandilhon C, Bechet D, Gellen B, Bartolucci P, Féasson L.**

Beneficial effects of a moderate-intensity endurance-exercise training on skeletal muscle microvasculature in patients with sickle cell disease.

*En révision dans Haematologica.*

## **Contexte et objectif**

Les travaux de Ravelojaona et al. (2015) ont mis en évidence un profond remodelage du réseau microvasculaire musculaire des patients drépanocytaires limitant notamment la capacité d'oxygénation de ce tissu. Les effets bénéfiques de l'entraînement en endurance sur la microvascularisation étant bien connus dans la littérature, que ce soit chez des sujets sains (Messonnier et al. 2001 ; Charifi et al. 2004 ; Cocks et al. 2013 ; Cocks et al. 2015 ; Baum et al. 2015) ou pathologiques (Gouzi et al. 2013 ; Lewis et al. 2015), l'objectif de cette étude était de déterminer la présence et le type d'adaptations du réseau microvasculaire musculaire des patients drépanocytaires en réponse à ce mode d'entraînement. Nous avons émis les hypothèses qu'en réponse à un tel entraînement i) l'oxygénation musculaire pourrait être essentiellement améliorée par une augmentation de la densité capillaire et que ii) la tortuosité des capillaires resterait inchangée.

## **Méthodes**

Pour répondre à ces hypothèses, des techniques d'immunohistochimies sur coupes sériées ont été réalisées afin de mettre en évidence le réseau microvasculaire et la typologie des fibres musculaires. De nombreux paramètres du réseau microvasculaire ont ainsi été mesurés permettant l'analyse de la morphologie des capillaires (surface, périmètre, diamètre et tortuosité), des caractéristiques du réseau (densité capillaire, nombre de capillaires autour d'une fibre) et des indices fonctionnels (surface fonctionnelle d'échange, indice d'oxygénation). Pour certains, ces indices ont été analysés par type de fibre musculaire (voir partie matériels et méthodes).

## **Résultats et discussion**

Dans un premier temps, nous avons pu confirmer sur les biopsies initiales et chez les patients contrôles (non entraînés), la présence des altérations (raréfaction des microvaisseaux) et adaptations (élargissement de ces derniers) préalablement observées chez des patients drépanocytaires (Ravelojaona et al. 2015). Le fait d'avoir observé que la raréfaction des microvaisseaux était plus sévère dans la présente étude pourrait s'expliquer par le fait que nos patients étaient plus âgés d'environ 10 ans (34 vs 24 ans). Après 8 semaines d'entraînement en endurance, de nombreuses adaptations du réseau microvasculaire des patients ont été observées.

Tout d'abord, des augmentations de la densité capillaire (+17%,  $P < 0,01$ ), du nombre de capillaires autour d'une fibre (+18%,  $P < 0,05$ ) et de la surface fonctionnelle d'échange (+42%,  $P < 0,001$ ) ont été observées chez les patients entraînés. L'augmentation de ces 2 derniers paramètres est spécifique en fonction du type de fibre. Si la surface fonctionnelle d'échange est augmentée à la fois pour les fibres de type I et de type IIA (+48%,  $P < 0,001$  ;

+35%,  $P < 0,001$  respectivement), le nombre de microvaisseaux autour d'une fibre est augmenté uniquement pour les fibres de type I (+23%,  $P < 0,01$ ). Les résultats de cette étude montrent que les caractéristiques morphologiques des capillaires (périmètre, surface, diamètre et tortuosité) sont inchangées en réponse à un tel entraînement. Nous pouvons donc supposer que l'élargissement et la faible tortuosité des microvaisseaux : i) constituent un mécanisme protecteur des troubles hémodynamiques et hémorhéologiques pendant l'exercice, ii) semblent être adaptés à l'augmentation du flux sanguin qui se produit lors d'un exercice, et iii) facilitent l'apport d'oxygène au tissu musculaire. Bien que les résultats de cette étude indiquent clairement une amélioration de l'oxygénation musculaire des patients entraînés, il est cependant difficile d'avoir une mesure directe du transport de l'oxygène. Des indices indirects peuvent cependant nous fournir quelques indications. Le produit, densité capillaire  $\times$  surface des capillaires, est augmenté chez les patients entraînés suggérant une plus grande surface disponible pour l'échange des gaz et des métabolites ( $P < 0,05$ ). Pour améliorer l'estimation de l'efficacité d'approvisionnement en oxygène musculaire, le taux d'hémoglobine est un élément critique à considérer. Ainsi, en pondérant le produit précédent par le degré d'anémie (densité capillaire  $\times$  surface des capillaires  $\times$  concentration en hémoglobine), une tendance à l'augmentation est observée ( $P = 0,08$ ), suggérant une meilleure capacité d'oxygénation musculaire des patients entraînés.

## **Conclusion**

Ainsi, un entraînement en endurance contrôlé et réalisé à une intensité modérée permet d'augmenter le nombre de microvaisseaux des patients drépanocytaires. Cette relative re-densification du réseau capillaire permet un meilleur apport sanguin au tissu musculaire, améliorant ainsi la surface d'échange des gaz et métabolites entre ces microvaisseaux et les fibres musculaires adjacentes.

Haematologica  
HAEMATOL/2018/208025  
Version 1

Beneficial effects of a moderate-intensity endurance-exercise  
training on skeletal muscle microvasculature in sickle cell disease  
patients

Angèle N Merlet, Laurent A Messonnier, Cécile Coudy-Gandilhon,  
Daniel Béchet, Barnabas Gellen, Pablo Bartolucci, and Léonard  
Féasson

Disclosures: None.

Contributions: LAM, LF, BG, and PB designed and conducted this study. CCG and DB contributed to the histological technical assistance. ANM performed the analyses and wrote the first draft of the article. All authors critically reviewed the draft and approved the final version for publication.



1 **Beneficial effects of a moderate-intensity endurance-exercise training on**  
2 **skeletal muscle microvasculature in sickle cell disease patients**

3

4 Angèle N Merlet, Laurent A Messonnier, Cécile Coudy-Gandilhon, Daniel Béchet, Barnabas

5 Gellen, Pablo Bartolucci, Léonard Féasson

6

7 **Univ. Lyon, UJM-Saint-Etienne, Inter-university Laboratory of Human Movement**

8 **Sciences, EA7424, F-42023 Saint-Etienne, France (A N Merlet MSc, Prof L Féasson PhD),**

9 **Univ. Savoie Mont Blanc, Inter-university Laboratory of Human Movement Sciences**

10 **EA7424, F-73000 Chambéry, France (Prof L A Messonnier PhD), INRA, UMR1019,**

11 **Human Nutrition Unit, CRNH Auvergne F-63122 Saint Genès Champanelle, France (C**

12 **Coudy-Gandilhon BSc, Prof D Béchet), Department of Cardiac Rehabilitation, Henri-**

13 **Mondor University Hospital, AP-HP, Creteil, France (B Gellen MD), ELSAN,**

14 **Polyclinique de Poitiers, France (B Gellen MD), Department of Internal Medicine, Henri**

15 **Mondor University Hospital-UPEC, AP-HP, Créteil, France (Prof P Bartolucci MD),**

16 **Department of Public Health, Henri Mondor University Hospital-UPEC, AP-HP, Créteil,**

17 **France (Pof P Bartolucci MD), Myology Unit, Referent Center of Rare Neuromuscular**

18 **Diseases, Euro-NmD, University Hospital of Saint-Etienne, France (Prof L Féasson PhD).**

19

20

21

22

23

24 **Correspondence to:**

25 Léonard Féasson,

26 Unité de Myologie, Bâtiment IRMIS, Campus Santé Innovations, Hôpital Nord

27 42 055 CHU de St Etienne, Cedex 2,

28 France

29 [leonard.feasson@univ-st-etienne.fr](mailto:leonard.feasson@univ-st-etienne.fr)

30

31 **Summary**

32 **Background** Sickle cell disease (SCD) is a genetic hemoglobinopathy leading to two major  
33 clinical manifestations: severe chronic hemolytic anemia and iterative vaso-occlusive crisis.  
34 SCD is accompanied by profound muscle microvascular remodeling, contributing to impaired  
35 oxygen delivery to muscle tissue. The beneficial effects of endurance training on  
36 microvasculature are widely known. The aim of this study was to evaluate the effects of a  
37 training program on microvascular adaptations of skeletal muscle of SCD patients.

38 **Methods** Forty SCD patients were randomized into two groups: the trained group followed a  
39 training program in endurance (personalized, moderate, and controlled intensity) while the  
40 untrained control group maintained a normal lifestyle. Training consisted of three 45-minute  
41 cycle ergometer exercise sessions per week for eight weeks. Individual exercise intensity was  
42 determined from a submaximal cardio-pulmonary exercise test (CPET). A biopsy of the *vastus*  
43 *lateralis* muscle was performed before and after the intervention.

44 **Findings** Histological analysis highlighted microvascular benefits in SCD patients after the  
45 training program with increases in capillary density (CD) ( $p=0.003$ ), number of capillaries  
46 around a fibre (CAF) ( $p=0.015$ ), and functional surface of exchange (LC/PF) ( $p<0.0001$ )  
47 compared to untrained controls patients. Conversely, no significant between-group difference  
48 was found for change of the morphology of capillaries.

49 **Interpretation** A well-controlled moderate-intensity endurance-exercise training program  
50 improves the oxygen delivery to the muscle tissue and partly reverses the microvascular deficits  
51 commonly observed in SCD patients.

52 **Funding** None.

53

**54 Introduction**

55 Sickle cell disease (SCD) is the most common life-threatening genetic hemoglobinopathy  
56 worldwide, affecting millions of people and causing substantial morbidity and early mortality.<sup>1</sup>  
57 One single mutation of the gene that encodes for the synthesis of  $\beta$ -globin leads to synthesis of  
58 abnormal hemoglobin (HbS). When deoxygenated, HbS may polymerize, eventually resulting  
59 in the sickling of red blood cells (RBC).<sup>2</sup> Sickled RBCs are less deformable and adhere  
60 abnormally to endothelium, causing severe blood circulatory disorders.<sup>3</sup> In that context, the  
61 entrapment of RBCs into the microcirculation is promoted and could progress to painful, and  
62 potentially critical, vaso-occlusive crises.<sup>2</sup> Sickled RBCs are also fragile and break easily,  
63 potentially leading to massive hemolysis which is not compensated by erythropoiesis and  
64 resulting in a severe chronic hemolytic anemia.<sup>2</sup> Anemia and arterial oxygen Hb desaturation  
65 generally observed in SCD patients<sup>4,5</sup> may collectively depress oxygen transport and potentially  
66 induce tissue hypoxia, as observed in the brain<sup>6,7</sup> and also at the muscular level.<sup>8,9</sup> In addition  
67 to lower Hb concentration and arterial desaturation, reduced resting muscular oxygenation<sup>8,9</sup>  
68 may also be attributed to the profound muscle microvascular remodeling described in SCD.  
69 Indeed, both lower CD and tortuosity have been observed in SCD patients than in healthy  
70 subjects.<sup>10</sup> In sickle cell trait carriers (SCT), the heterozygous form of SCD, a similar  
71 remodeling has also been shown, but to a lesser extent.<sup>11</sup> Decreases in CD and tortuosity  
72 drastically reduce the exchange surface and increase the diffusion distance for oxygen, both of  
73 which are extremely detrimental for oxygen delivery to muscle tissue. In that context, any  
74 strategy that would reverse this deleterious microvascular remodeling is of interest.

75 It is well-established that endurance exercise training is an effective way to improve  
76 muscle oxygen supply by increasing CD and/or tortuosity, both in healthy subjects and in  
77 pathological conditions.<sup>12-19</sup> These microvascular benefits were also observed in active SCT  
78 carriers compared to sedentary counterparts.<sup>20</sup> Considering both the feasibility and the safety

79 of exercise in this population,<sup>21</sup> we proposed eight weeks of individualized moderate-intensity  
80 supervised endurance-exercise training on a cycle ergometer in adult SCD patients without  
81 severe chronic complications.<sup>22</sup> This exercise program could therefore be considered as a  
82 strategy to reverse, at least in part, the skeletal muscle microvasculature disturbances of adult  
83 SCD patients. These analyses constitute an important secondary efficacy outcome of such  
84 program in SCD.

85 We hypothesized that the impact of the moderate-intensity endurance-exercise training  
86 on skeletal muscle microvasculature of this SCD patients would i) lead to enlargement of  
87 capillaries without modification of their tortuosity, as reported by Vincent and colleagues<sup>20</sup>, and  
88 ii) improve muscle oxygen supply, in particular by increasing the number of capillaries.

89

## 90 **Methods**

### 91 **Study design and participants**

92 Among the 40 adult homozygous SCD patients included, 33 (83%) completed this study [34  
93 (10) years old, 18 men (55%) and 15 women (45%)]. Patients' baseline characteristics have  
94 been previously reported and were similar between groups.<sup>22</sup> This study took place at APHP -  
95 Henri Mondor University Hospitals in the reference center for major sickle cell syndromes, the  
96 cardiac rehabilitation unit, and the functional and respiratory explorations unit in Créteil,  
97 France. Eligible volunteers were informed of the purposes, procedures, and possible associated  
98 risks and/or discomforts related to the protocol before they gave written informed consent. The  
99 experiment was approved by the local ethics committee and conformed to the standards set by  
100 the Declaration of Helsinki for human studies. The University Hospital of Saint-Etienne was  
101 the promoter of this study (ClinicalTrials.gov NCT02571088). All patients underwent  
102 preliminary screening, including a medical examination and blood phenotype analysis.  
103 Exclusion criteria were: participation in another clinical trial, a chronic inflammatory or

104 infectious disease, any intercurrent medical event within the month preceding inclusion, clinical  
105 signs and/or history of heart failure, left ventricular ejection fraction <50%, pulmonary arterial  
106 hypertension with tricuspid regurgitation velocity >2.8 m/s, atrial fibrillation, ventricular  
107 arrhythmias, left ventricular hypertrophy, significant valvulopathy, known coronary disease,  
108 uncontrolled hypertension, treatment with anti-arrhythmia drugs, including  $\beta$ -blockers, current  
109 anti-coagulant treatment, a pacemaker or defibrillator, known cerebral vasculopathy, prior  
110 stroke, epilepsy, pregnancy or lactation, hip osteonecrosis and/or the incapacity to understand  
111 the aims, the design, and the possible risks of the study protocol.

112

### 113 **Procedure**

114 SCD patients performed a submaximal CPET and, at least five days later, a muscle biopsy was  
115 taken. Then patients were randomly (1:1) assigned to either a trained (N=20) or an untrained  
116 control (N=20) group. Subsequently, the patients in the trained group performed a supervised  
117 endurance-exercise training program while the patients in the untrained control group  
118 maintained their usual lifestyle. The submaximal CPET was repeated and a second biopsy  
119 sample was taken under the same conditions eight weeks later, after the end of the training  
120 period for the trained group.

121

### 122 Submaximal cardio-pulmonary exercise-tests

123 The tests were performed on a cycle ergometer (Ergoselect Confort, General Electric, USA).  
124 Exercise started at a workload of 20 or 30 W and increased every two minutes by 10 or 15 W  
125 for females and males, respectively. Electrocardiogram and gas exchange (ErgoCard, Medisoft,  
126 Sorinnes, Belgium) were continuously recorded while blood lactate concentration (Lactate  
127 Scout+, EKF diagnostics, Cardiff, UK) was assessed every minute. Blood pressures and the  
128 rate of exertion were recorded every two minutes. Exercise was stopped as soon as a blood



129 lactate concentration  $\geq 4$  mmol/liter was recorded. Exercise was followed by two minutes of  
130 active recovery and eight minutes of passive recovery. The training workload, corresponding  
131 to the power output at a blood lactate concentration of 2.5 mmol/liter, was determined.

132

### 133 Muscle biopsy

134 All muscle biopsies were obtained the week before and after the intervention (i.e. eight weeks  
135 of the supervised rehabilitation program for the trained group and eight weeks of normal activity  
136 for the untrained control group) from the *vastus lateralis* using the percutaneous technique.<sup>23</sup>

137 After shaving, asepsis was obtained using alcohol and 10% iso-Betadine (MEDA Pharma,  
138 Paris, France). Then a local anesthesia of cutaneous and subcutaneous tissues was attained (2%  
139 lidocaine, AstraZeneca, Rueil-Malmaison, France), without cutting the muscular aponeurosis.

140 A small incision (not exceeding 8 mm) was made through which the Weil-Blakesley forceps  
141 (Lawton, Tittlingen, Germany) was introduced in the subjacent muscle and the sample extracted  
142 (approximately 150 to 200 mg). Hemostasis was then ensured by five minutes of compression  
143 and the access closed by sterile strips. Part of the biopsy sample that contained well-identified  
144 fascicles were oriented under a stereo microscope and mounted in cryomount® (Histolab,  
145 Göteborg, Sweden), then frozen in isopentane (Chevron Phillips Chemicals International,  
146 Overijse, Belgium), and finally stored in liquid nitrogen until histochemical and  
147 immunohistochemically analyses. The remainder of the samples were frozen and stored in  
148 liquid nitrogen until further analysis.

149

### 150 Endurance-exercise training protocol

151 Patients in the trained group performed a physical activity program (moderate-intensity  
152 endurance-exercise training) comprised of 24 exercise sessions on a cycle ergometer (three  
153 sessions a week for eight weeks). Each session consisted of: i) an initial warm-up (five minutes

154 at 70% of the workload), ii) a constant-load endurance exercise (30 minutes at 100% of the  
155 workload), iii) cool-down (five minutes at 70% of the workload), and then iv) light stretching  
156 (five minutes). Particular attention was paid to the appropriate hydration of patients during each  
157 session by encouraging patients to drink regularly and by providing them water *ad libitum*.  
158 During each exercise session, a physician was present for the clinical observation of patients.  
159 Blood pressure, transcutaneous oxygen saturation and blood-lactate concentration were  
160 measured, and self-perceived exertion rated during each session. If necessary, the exercise  
161 workload was modified between sessions so that blood lactate concentrations during the  
162 training sessions approximately matched the target of 2.5 mmol/liter.

163

#### 164 **Muscle analysis**

165 Histological analysis of one patient in the untrained control group was not performed because  
166 the biopsy sample was of poor quality. In total, biopsies of 32 (97%) of 33 patients were  
167 analyzed [17 men (53%) and 15 women (47%)], 17 in the untrained control group [ten men  
168 (59%) and seven women (41%)] and 15 in the trained group [eight men (53%) and seven women  
169 (47%)].

170

#### 171 Muscle fiber types

172 Fiber type determination was performed by immunofluorescence on two serial cross-sections.  
173 Anti-laminin- $\alpha$ 1 (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) was conjugated to Alexa-Fluor 488  
174 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) to identify the extracellular matrix. Additionally,  
175 monoclonal antibodies against myosin heavy-chain-I (MHC-I) (BA-D5, DSHB) or MHC-IIa  
176 (N2.261, Enzo life Sciences) were conjugated to Alexa-Fluor 546 (Invitrogen, Cergy-Pontoise,  
177 France) to identify the different fiber types. Images were captured with a high-resolution cooled  
178 digital DP-72 camera coupled to a BX-51 microscope (Olympus, Rungis, France) at a resolution

179 of 0.64  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ . For each patient and condition, approximately three representative fields of  
180 120 fibers were selected. Using the image processing software Visilog-6-9 (Noesis, Gif-sur-  
181 Yvette, France) the contractile type (I, I-IIA, IIA, IIA-IIX or IIX) was determined for each fiber,  
182 as previously described.<sup>24</sup>

183

#### 184 Microvascular network analysis

185 Morphometric analysis of microvasculature was performed as previously described.<sup>10,11</sup> The  
186 capillaries were stained with CD31 antibody (Dako, Glostrup, Denmark), which recognizes  
187 platelet endothelial cell adhesion molecule-1 expressed in vascular endothelial cells. The  
188 software ImageJ was used to analyze the microvascular network. A representative field was  
189 chosen to measure the morphological characteristics of the capillaries: capillary surface area  
190 (CSA), capillary perimeter (CP), capillary outer diameter (COD), and capillary tortuosity  
191 (CapTor). On average, 90 capillaries were analyzed. In the same field, microvascular  
192 characteristics were measured: CD (number of capillaries per  $\text{mm}^2$ ), CAF (number of capillaries  
193 in contact with a single muscle fiber), and the length of contact between a muscle fiber and the  
194 surrounding capillaries (LC) associated with the fiber perimeter (PF) (LC/PF). Previously, the  
195 product  $\text{CD} \times \text{CSA}$  was used to estimate the instantaneous volume of blood that crosses the 10  
196  $\mu\text{m}$ -thick section. To better assess oxygen delivery capacity in skeletal muscle, we propose in  
197 the present study to incorporate hemoglobin concentration to this product ( $\text{CD} \times \text{CSA} \times [\text{Hb}]$ ).  
198 The ratio LC/PF which indicates the surface of exchange between a muscle fiber and the  
199 surrounding capillaries was also calculated. Additionally, LC/PF and CAF were analyzed by  
200 fiber type considering an average of 25 fibers per fiber type in the same field. Only three fiber  
201 types were considered: muscle fiber types I, IIA, and IIX. Type I-IIA and IIA-IIX fibers were  
202 integrated into type I and IIA fibers, respectively.

203

**204 Statistical analysis**

205 Descriptive results are presented as means  $\pm$  [standard deviation (SD)] or medians  $\pm$  [inter-  
206 quartile range (IQR)] depending on the normality of each variable as assessed by the Shapiro-  
207 Wilk test. The statistical analysis compared the relative mean change between groups (untrained  
208 vs trained). T-tests for independent groups or Mann-Whitney tests were used according to the  
209 normality of the variable. The critical level for statistical significance was set at 5%. Analysis  
210 were computed with Statistica 8 (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

211

**212 Role of the funding source**

213 There was no funding source for this study. The corresponding author had full access to all the  
214 data in the study and had final responsibility for the decision to submit the manuscript for  
215 publication.

216

**217 Results**

218 No significant between-group differences were found for changes from baseline of  
219 microvascular characteristics (table 1). Changes in microvascular characteristics after eight  
220 weeks of moderate-intensity endurance-exercise training in SCD patients are presented in table  
221 2. No significant between-group differences were found for the morphological characteristics  
222 of capillaries (CP, CSA, COD, and CapTor). In addition, no changes were observed in the  
223 percentage of capillaries with COD  $<5 \mu\text{m}$ , between 5 and  $10 \mu\text{m}$ , and  $> 10 \mu\text{m}$ . Conversely,  
224 the changes in CD (already mentioned in Gellen and colleagues,<sup>22</sup>) and CAF (figure 1B) were  
225 significantly increased in the trained group compared to the untrained control group  
226 (respectively, +17%,  $p=0.003$ ; +18%,  $p=0.015$ ). In addition, the change in CAF was  
227 significantly increased in trained SCD patients compared to untrained controls in type I muscle  
228 fibers (+23%,  $p=0.0004$ ), but not in other fiber types (figure 1B). The change in the functional

229 surface of exchange between capillaries and muscle fibers (LC/PF) was significantly increased  
230 in trained patients compared to untrained control patients (+42%,  $p < 0.0001$ ; figure 1C). In  
231 addition, fiber type analysis showed that LC/PF was increased in the trained group compared  
232 to the untrained control group in both type I and IIa muscle fibers (respectively, +48%,  
233  $p < 0.0001$  and +35%,  $p = 0.0001$ ) but not in type IIX muscle fibers (figure 1C). The increase in  
234 LC/PF is mainly due to the contact length between muscle fibers and the surrounding capillaries  
235 (LC) strongly increasing (+50%,  $p = 0.0001$ ) in the trained group while being unchanged in PF  
236 (data not shown,  $p = 0.122$ ). The product  $CD \times CSA$ , to estimate the surface area available for  
237 gaseous and metabolite exchange in a 10- $\mu\text{m}$  thick slice, was increased in trained patients  
238 compared to untrained patients (+26%,  $p = 0.040$ ; figure 2A). When [Hb] was incorporated to  
239 this index ( $CD \times CSA \times [\text{Hb}]$ ) to better assess oxygen delivery capacity in skeletal muscle, a  
240 non-significant increase was observed in trained group compared to untrained patients  
241 ( $p = 0.081$ ) (figure 2B).

242

## 243 **Discussion**

244 The present study is the first clinical randomized controlled trial evaluating the impact of an  
245 eight-weeks personalized moderate-intensity endurance-exercise training program on skeletal  
246 muscle microvasculature characteristics in SCD patients. The main findings are that endurance-  
247 exercise training did not induce changes in the morphology of capillaries (CP, CSA, COD, and  
248 CapTor) and is an effective way to enhance muscle oxygen supply by increasing CD, CAF, and  
249 functional indexes. Taken together, these results confirm our hypothesis that moderate-intensity  
250 endurance-exercise training improves muscle oxygen supply in trained SCD patients.

251 At baseline, the present study confirmed the capillary rarefaction and enlargement  
252 previously reported in SCD patients.<sup>10</sup> Of note, in the present study capillary rarefaction was  
253 even more pronounced than previously reported (respectively, 195 (32) vs 270 (20) cap-mm<sup>2</sup>).

254 The difference between studies may be explained by the patients in the present study being  
255 older (respectively, 34 (10) vs 24 (5) years old) and therefore more affected by the disease.

256 The morphological characteristics of the capillaries (CP, CSA, COD, and CapTor) were  
257 unchanged in both groups. As previously specified, it is important to note that SCD patients  
258 display profound remodeling of their microvasculature, and in particular of their capillaries,  
259 including dramatic lumen enlargement without reinforcement of the capillary wall and low  
260 tortuosity compared to sedentary counterparts.<sup>10</sup> These adaptations could i) reduce flow  
261 resistance and sickle RBC transit time, ii) limit the associated local blood flow disturbances,  
262 and iii) facilitate passage of the less deformable HbS-containing erythrocytes through the  
263 capillary network, contributing to alleviate (but not eliminate) the risk of erythrocytes jamming  
264 in the microvasculature. Thus, knowing that capillary diameter enlargement potential is small  
265 in response to endurance training,<sup>25</sup> this particular microvasculature remodeling seems adapted  
266 to the passage of sickle RBCs through the microvascular network during moderate-intensity  
267 exercise. In accordance, Baum and colleagues<sup>19</sup> reported that CSA and PF were unchanged in  
268 response to endurance exercise in healthy subjects despite internal rearrangement of the  
269 capillary compartments (i.e. increase of pericyte and endothelial cell thickness and decrease of  
270 basement membrane thickness). Interestingly, the authors suggested that intensified pericyte  
271 mobilization and basement membrane thinning are related to exercise-induced angiogenesis in  
272 human skeletal muscle. In that sense, we may speculate that despite the lack of modification in  
273 capillary morphology in SCD patients, ultrastructure analysis of capillaries could indicate  
274 internal rearrangement related to exercise-induced angiogenesis. Vincent and colleagues<sup>20</sup>  
275 showed that regular physical activity increases both CSA and COD in SCT carriers, yet CapTor  
276 remained unchanged, as in the present study. These results were not surprising because SCT  
277 carriers display less enlargement of their capillaries than SCD patients whereas CapTor is  
278 similar with SCD patients.<sup>10</sup> In other words, the amplification of these interferences with



279 training in SCT carriers could be a way to further reduce the hemorheological disturbances<sup>20</sup>  
280 and to facilitate passage of less deformable HbS-containing erythrocytes through the capillary  
281 network during exercise. In that sense, a few studies have demonstrated that chronic moderate-  
282 intensity physical activity enhances vascular function by improvement in nitric oxide  
283 bioavailability in SCD patients<sup>26</sup> and decreases both oxidative stress<sup>27</sup> and endothelial  
284 activation<sup>28</sup> in a mice model of SCD. Taken together, we speculate that remodeling of skeletal  
285 muscle microvasculature of SCD patients constitutes a protective mechanism of  
286 hemorheological disturbances during exercise. This remodeling seems to be adapted to the  
287 increase in blood flow that occurs during moderate-intensity exercise and facilitates oxygen  
288 supply to muscle tissue.

289 In agreement with our original hypothesis, the present study highlighted beneficial  
290 effects of a moderate-intensity endurance-exercise training on skeletal muscle microvasculature  
291 of SCD patients. The significant increase in CD, CAF and LC/PF with training clearly indicates  
292 i) better blood supply to muscle tissue, ii) increased exchange surface area between capillaries  
293 and muscle fibers, in particular in gas (e.g. oxygen and carbon dioxide) and metabolite (e.g.  
294 glucose and lactate), and iii) decreased diffusion distance for oxygen, that is very beneficial for  
295 oxygen delivery to the muscle tissue. These findings are in agreement with previous studies  
296 demonstrating the potential for endurance training to increase skeletal muscle capillarization in  
297 healthy and pathological populations.<sup>12-19</sup> Increased LC/PF is partly explained by the marked  
298 increment of LC without modification of PF, possibly due to i) greater capillary tortuosity  
299 (CapTor), ii) an increase in the number of capillaries, iii) enlargement of the capillaries (COD),  
300 or iv) a combination thereof. Because CapTor and COD were not modified by the training  
301 program, enhancement of the LC/PF index is mainly due to the increase in number of  
302 capillaries. Interestingly, CAF and LC/PF increased both in type I muscle fibers that can be  
303 explained by the type I fibers preferential recruitment during moderate-intensity endurance-

304 exercise training. Charifi and colleagues<sup>15</sup> similarly confirmed the fiber-type specific response  
305 in elderly men. The authors showed that LC/PF increased more for type II muscle fibers (+69%)  
306 than for type I muscle fibers (+39%), which can be explained by the higher training intensity  
307 used in their study than ours. Finally, all these data clearly indicate an enhancement in oxygen  
308 supply in trained SCD muscle due to the increase in the number of capillaries. While the  
309 underlying mechanisms of the observed capillary growth is not known, shear stress, induced by  
310 increased blood flow to the muscle, and passive stretch of the muscle tissue and vascular bed,  
311 may play a crucial role leading strong angiogenic signaling.<sup>29,30</sup> In addition, functional indirect  
312 indexes used in the present study provide some insight on measure of oxygen transport. The  
313 product  $CD \times CSA$ , used to estimate the surface area available for gaseous and metabolite  
314 exchange in a 10- $\mu$ m thick slice, increased in the trained group. However, to assess true  
315 efficiency of muscle oxygen supply, Hb level is a critical component to consider. Therefore, by  
316 correcting the previous product to the degree of anemia ( $CD \times CSA \times [Hb]$ ), a non-significant  
317 increase ( $p=0.08$ ) was observed in the trained group compared to the untrained control group  
318 suggesting the possibility of better muscle oxygen delivery capacity in trained SCD patients.

319 Data from the present study have important clinical implications for SCD patients.  
320 Indeed, improved oxygen delivery to the muscle tissue could significantly reduce fatigue and  
321 improve motor function, resulting in increased physical capacity and improved quality of life  
322 of SCD patients.<sup>31</sup> Clinicians are thus encouraged to promote individualized moderate-intensity  
323 endurance-exercise training compatible with patients' daily professional and social activities as  
324 a therapeutic approach.

325

### 326 **Conclusion**

327 In summary, the present study demonstrates for the first time that a moderate-intensity  
328 endurance-exercise training program over eight weeks improves skeletal muscle

329 microvasculature in patients with SCD and thus partly reverses the microvascular deficits  
330 previously observed in SCD patients. The microvascular benefits include improvement in CD  
331 and functional exchange surface between capillaries and muscle fibers facilitating oxygen  
332 delivery to the muscle tissue. The morphology of capillaries was also unchanged in response to  
333 endurance-exercise training suggesting that remodeling of skeletal microvasculature of SCD  
334 patients (i.e. low CapTor and high COD) is adapted to the increase in blood flow that occurs  
335 during exercise. Thus, moderate-intensity endurance-exercise training appears to be of great  
336 interest given the microvascular improvements highlighted in the present study.

337

#### 338 **Contributors**

339 LAM, LF, BG, and PB designed and conducted this study. CCG and DB contributed to the  
340 histological technical assistance. ANM performed the analyses and wrote the first draft of the  
341 article. All authors critically reviewed the draft and approved the final version for publication.

342

#### 343 **Declaration of interests**

344 We declare no competing interests.

345

#### 346 **Acknowledgments**

347 We thank John Temesi for editorial assistance. We also thank Marie-Pierre Blanc, Dominique  
348 Gouttefangeas, and Marion Ravelojaona (Myology Unit, Referent Center of Rare  
349 Neuromuscular Diseases, Euro-NmD, University Hospital of Saint-Etienne, France) for helpful  
350 technical assistance.

351

352 **References**

- 353 1 Ware RE, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR. Sickle cell disease. *Lancet*  
354 2017; **390**: 311-323.
- 355 2 Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 2017; **377**: 305.
- 356 3 Connes P, Verlhac S, Bernaudin F. Advances in understanding the pathogenesis of  
357 cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 2013; **161**: 484-98.
- 358 4 Quinn CT, Sargent JW. Daytime steady-state haemoglobin desaturation is a risk factor  
359 for overt stroke in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 2008; **140**: 336-9.
- 360 5 Setty BN, Stuart MJ, Dampier C, Brodecki D, Allen JL. Hypoxaemia in sickle cell  
361 disease: biomarker modulation and relevance to pathophysiology. *Lancet* 2003; **362**:  
362 1450-5.
- 363 6 Nahavandi M, Tavakkoli F, Hasan SP, Wyche MQ, Castro O. Cerebral oximetry in  
364 patients with sickle cell disease. *Eur J Clin Invest* 2004; **34**: 143-8.
- 365 7 Nahavandi M, Nichols JP, Hassan M, Gandjbakhche A, Kato GJ. Near-infrared spectra  
366 absorbance of blood from sickle cell patients and normal individuals. *Hematology* 2009;  
367 **14**: 46-8.
- 368 8 Waltz X, Pichon A, Lemonne N, et al. Normal muscle oxygen consumption and  
369 fatigability in sickle cell patients despite reduced microvascular oxygenation and  
370 hemorheological abnormalities. *PLoS One* 2012; **7**: e52471.
- 371 9 Charlot K, Antoine-Jonville S, Moeckesch B, et al. Cerebral and muscle microvascular  
372 oxygenation in children with sickle cell disease: Influence of hematology,  
373 hemorheology and vasomotion. *Blood Cells Mol Dis* 2017; **65**: 23-28.
- 374 10 Ravelojaona M, Féasson L, Oyono-Enguélé S, et al. Evidence for a profound  
375 remodeling of skeletal muscle and its microvasculature in sickle cell anemia. *Am J*  
376 *Pathol* 2015; **185**: 1448-56.

- 377 11 Vincent L, Féasson L, Oyono-Enguélé S, et al. Remodeling of skeletal muscle  
378 microvasculature in sickle cell trait and alpha-thalassemia. *Am J Physiol Heart Circ*  
379 *Physiol* 2010; **298**: H375-84
- 380 12 Messonnier L, Freund H, Féasson L, et al. Blood lactate exchange and removal abilities  
381 after relative high-intensity exercise: effects of training in normoxia and hypoxia. *Eur J*  
382 *Appl Physiol* 2001; **84**: 403-12.
- 383 13 Gouzi F, Préfaut C, Abdellaoui A, et al. Blunted muscle angiogenic training-response  
384 in COPD patients versus sedentary controls. *Eur Respir J* 2013; **41**: 806-14.
- 385 14 Charles M, Charifi N, Verney J, et al. Effect of endurance training on muscle  
386 microvascular filtration capacity and vascular bed morphometry in the elderly. *Acta*  
387 *Physiol (Oxf)* 2006; **187**: 399-406.
- 388 15 Charifi N, Kadi F, Féasson L, Costes F, Geysant A, Denis C. Enhancement of  
389 microvessel tortuosity in the vastus lateralis muscle of old men in response to endurance  
390 training. *J Physiol* 2004; **554**: 559-69.
- 391 16 Lewis MI, Fournier M, Wang H, Storer TW, Casaburi R, Kopple JD. Effect of  
392 endurance and/or strength training on muscle fiber size, oxidative capacity, and  
393 capillarity in hemodialysis patients. *J Appl Physiol (1985)* 2015; **119**: 865-71.
- 394 17 Cocks M, Shaw CS, Shepherd SO, et al. Sprint interval and endurance training are  
395 equally effective in increasing muscle microvascular density and eNOS content in  
396 sedentary males. *J Physiol* 2013; **591**: 641-56.
- 397 18 Cocks M, Shaw CS, Shepherd SO, et al. Sprint interval and moderate-intensity  
398 continuous training have equal benefits on aerobic capacity, insulin sensitivity, muscle  
399 capillarisation and endothelial eNOS/NAD(P)H oxidase protein ratio in obese men. *J*  
400 *Physiol* 2016; **594**: 2307-21.

- 401 19 Baum O, Gübeli J, Frese S, et al. Angiogenesis-related ultrastructural changes to  
402 capillaries in human skeletal muscle in response to endurance exercise. *J Appl Physiol*  
403 (1985) 2015; **119**: 1118-26.
- 404 20 Vincent L, Oyono-Enguélé S, Féasson L, et al. Effects of regular physical activity on  
405 skeletal muscle structural, energetic, and microvascular properties in carriers of sickle  
406 cell trait. *J Appl Physiol (1985)* 2012; **113**: 549-56.
- 407 21 Liem RI, Akinosun M, Muntz DS, Thompson AA. Feasibility and safety of home  
408 exercise training in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer* 2017; **64**.
- 409 22 Gellen B, Messonnier LA, Galactéros F, et al. Moderate-intensity endurance-exercise  
410 training in sickle-cell disease patients without severe chronic complications: a  
411 randomized-controlled trial. *Lancet Haematol* 2018.
- 412 23 Henriksson KG. "Semi-open" muscle biopsy technique. A simple outpatient procedure.  
413 *Acta Neurol Scand* 1979; **59**: 317-23.
- 414 24 Meunier B, Picard B, Astruc T, Labas R. Development of image analysis tool for the  
415 classification of muscle fibre type using immunohistochemical staining. *Histochem Cell*  
416 *Biol* 2010; **134**: 307-17.
- 417 25 Brown MD. Exercise and coronary vascular remodelling in the healthy heart. *Exp*  
418 *Physiol* 2003; **88**: 645-58.
- 419 26 Barbeau P, Woods KF, Ramsey LT, et al. Exercise in sickle cell anemia: effect on  
420 inflammatory and vasoactive mediators. *Endothelium* 2001; **8**: 147-55.
- 421 27 Charrin E, Aufradet E, Douillard A, et al. Oxidative stress is decreased in physically  
422 active sickle cell SAD mice. *Br J Haematol* 2015; **168**: 747-56.
- 423 28 Aufradet E, Douillard A, Charrin E, et al. Physical activity limits pulmonary endothelial  
424 activation in sickle cell SAD mice. *Blood* 2014; **123**: 2745-7.



- 425 29 Hudlicka O, Milkiewicz M, Cotter MA, Brown MD. Hypoxia and expression of VEGF-  
426 A protein in relation to capillary growth in electrically stimulated rat and rabbit skeletal  
427 muscles. *Exp Physiol* 2002; **87**: 373-81.
- 428 30 Egginton S, Hudlická O, Brown MD, Walter H, Weiss JB, Bate A. Capillary growth in  
429 relation to blood flow and performance in overloaded rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*  
430 (1985) 1998; **85**: 2025-32.
- 431 31 Merlet AN, Chatel B, Hourdé C, Ravelojaona M, Bendahan D, Féasson L, Messonnier  
432 LA. How Sickle Cell Disease Impairs Skeletal Muscle Function: Implications in Daily  
433 Life. *Med Sci Sports Exerc* 2018.
- 434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447

448 **Figures legends**

449

450 **Figure 1: Changes in muscle capillarization of muscle fibers of untrained and trained SCD patients**

451 (A) Representative images of serial cross-sections labeled (red) for either myosin heavy-chain I (MHC-I) or MHC-  
 452 IIA. Cross-sections were counter-stained for laminine- $\alpha$ 1 (green) to outline the fibers. Scale bars represent 100 $\mu$ m.  
 453 Mean changes in capillaries around fibers (CAF) (B) and functional exchange surface between capillaries and  
 454 muscle fibers. (LC/PF) (C) at the fiber level. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

455

456 **Figure 2: Changes in muscle microvascular oxygenation indexes of untrained and trained SCD patients**

457 Mean changes (A) in the surface area available for gaseous and metabolite exchange in a 10- $\mu$ m thick slice  
 458 (CD $\times$ CSA) (A) and (B) an estimate of oxygen supply capacity in skeletal muscle (CD $\times$ CSA $\times$ [Hb]). CD, capillary  
 459 density; CSA, capillary surface area; [Hb], hemoglobin concentration. \* $p < 0.05$ .

460

461 **Tables legends**

462

463 **Table 1: Baseline microvascular characteristics of untrained and trained SCD patients**

464 Results are expressed as mean (SD) or median [IQR]. CAF, number of capillaries around a single fiber; LC/PF,  
 465 length of contact between capillaries and the perimeter of the fiber; CP, capillary perimeter; CSA, capillary surface  
 466 area; COD, capillary outer diameter; CapTor, capillary tortuosity; Cap, capillary; Hb, hemoglobin concentration;  
 467 A·U, arbitrary units.

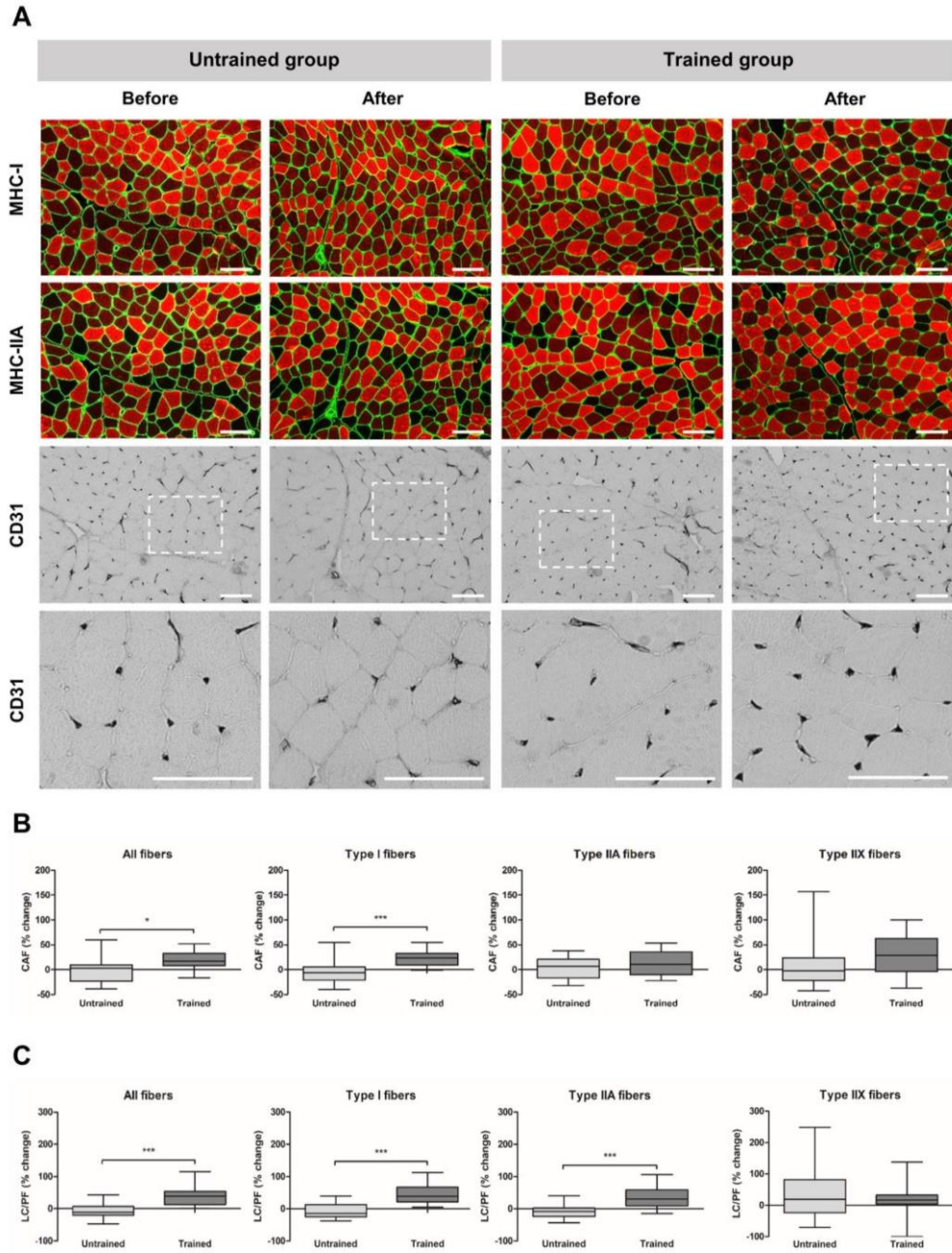
468

469 **Table 2: Changes in microvascular characteristics of untrained and trained SCD patients**

470 Results are expressed as mean (SD) or median [IQR]. **Bold** results are statistically significant at the  $p < 0.05$ . CAF,  
 471 number of capillaries around a single fiber; LC/PF, length of contact between capillaries and the perimeter of the  
 472 fiber; CP, capillary perimeter; CSA, capillary surface area; COD, capillary outer diameter; CapTor, capillary  
 473 tortuosity; Cap, capillary; Hb, hemoglobin concentration; A·U, arbitrary units.

474

475 **Figure 1**

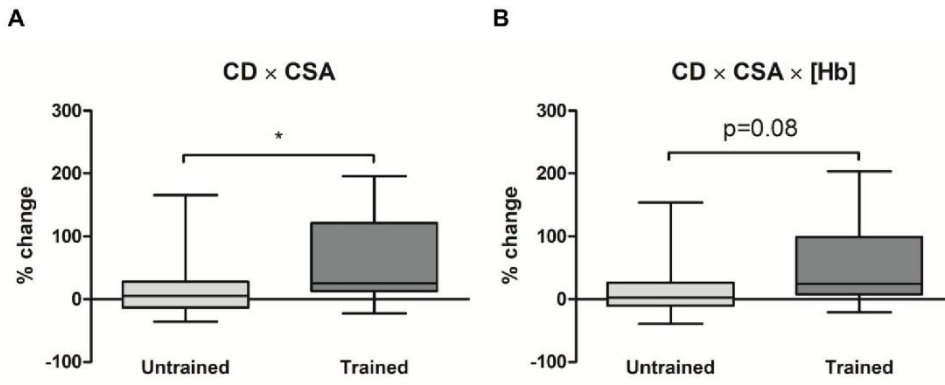


476

477

478

479 **Figure 2**



480

481

482 Table 1

Variables	All (N=32)	Untrained (N=17)	Trained (N=15)	p-value
<i>Morphological characteristics</i>				
CP, $\mu\text{m}$	46.6 (14.3)	48.4 (16.8)	44.4 (11.2)	0.439
CSA, $\mu\text{m}^2$	75.5 [44.4; 95.2]	80.7 [44.8; 95.6]	65.3 [45.9; 91.5]	0.558
COD, $\mu\text{m}$	5.70 [4.55; 6.31]	5.96 [4.67; 6.57]	5.03 [4.49; 6.17]	0.336
CapTor, A-U	1.08 (0.29)	1.11 (0.34)	1.05 (0.24)	0.585
Cap COD < 5 $\mu\text{m}$ , %	40.9 [25.1; 68.4]	30.8 [25.3; 68.3]	58.9 [26.5; 66.9]	0.637
Cap COD 5<x<10 $\mu\text{m}$ , %	56.4 [31.6; 70.3]	57.9 [31.8; 68.1]	41.1 [33.0; 71.0]	0.806
Cap COD >10 $\mu\text{m}$ , %	1.33 [0.00; 3.81]	1.67 [0.00; 1.26]	0.88 [0.00; 3.18]	0.485
<i>Microvascular characteristics</i>				
CD, cap-mm <sup>2</sup>	195 (32.0)	193 (30.7)	198 (34.2)	0.611
CAF				
All	2.41 [2.06; 2.76]	2.34 [2.04; 2.67]	2.47 [2.21; 2.81]	0.396
Type-I fiber	2.81 [2.44; 3.28]	2.84 [2.40; 3.13]	2.79 [2.55; 3.31]	0.748
Type-IIA fiber	2.22 [1.95; 2.47]	2.08 [1.95; 2.27]	2.33 [2.13; 2.51]	0.089
Type-IIX fiber	1.45 [1.17; 1.67]	1.29 [1.17; 1.53]	1.50 [1.27; 1.93]	0.443
<i>Functional indexes</i>				
LC, $\mu\text{m}$	27.7 (10.7)	28.5 (12.4)	26.8 (8.68)	0.653
LC/PF, %				
All	11.2 (3.28)	11.6 (3.85)	10.9 (2.58)	0.579
Type-I fiber	13.4 (3.26)	13.8 (3.73)	12.9 (2.77)	0.434
Type-IIA fiber	10.3 (3.16)	10.6 (3.51)	10.1 (2.92)	0.660
Type-IIX fiber	6.45 [4.71; 8.17]	5.45 [4.03; 8.19]	7.09 [6.05; 8.10]	0.292
CD*CSA, $\mu\text{m}^2\cdot\text{mm}^2$	14,400 (6622)	15,146 (7601)	13,554 (5444)	0.506
CD*CSA*[Hb], A-U	1.34 (0.60)	1.43 (0.64)	1.25 (0.59)	0.430

483

484 Table 2

Variables	Untrained (N=17) $\Delta$ relative (%)	Trained (N=15) $\Delta$ relative (%)	p-value
<i>Morphological characteristics</i>			
CP, $\mu\text{m}$	-5.10 [-14.7; +11.2]	+6.27 [-3.58; +36.3]	0.193
CSA, $\mu\text{m}^2$	-0.34 [-12.9; +13.2]	+13.6 [+0.91; +83.4]	0.180
COD, $\mu\text{m}$	+1.69 [-7.72; +8.60]	+4.02 [-1.85; +45.2]	0.375
CapTor, A-U	-3.64 [-10.1; +14.4]	+8.63 [-0.94; +19.9]	0.131
Cap COD < 5 $\mu\text{m}$ , %	-10.0 [-47.4; +8.11]	-19.8 [-58.5; +9.32]	0.355
Cap COD 5<x<10 $\mu\text{m}$ , %	+7.46 [-9.85; +33.9]	+14.8 [-5.66; +128]	0.396
Cap COD >10 $\mu\text{m}$ , %	+9.68 [-38.6; +114]	-7.79 [-34.1; +52.8]	0.661
<i>Microvascular characteristics</i>			
CD, cap-mm <sup>2</sup>	+2.61 (8.81)	+17.3 (16.2)	<b>0.003</b>
CAF			
All	-1.82 (24.2)	+18.1 (18.6)	<b>0.015</b>
Type-I fiber	-4.75 (21.8)	+23.0 (16.4)	<b>0.0004</b>
Type-IIA fiber	+3.04 (22.0)	+13.3 (24.4)	0.219
Type-IIX fiber	-2.78 [-21.5; +22.7]	+29.2 [+3.45; +57.1]	0.133
<i>Functional indexes</i>			
LC, $\mu\text{m}$	-6.09 (35.6)	+48.5 (34.7)	<b>0.0001</b>
LC/PF, %			
All	-6.82 (23.1)	+42.4 (32.8)	<b>&lt; 0.0001</b>
Type-I fiber	-7.90 (23.1)	+47.6 (32.6)	<b>&lt; 0.0001</b>
Type-IIA fiber	-8.46 (21.4)	+35.2 (33.7)	<b>0.0001</b>
Type-IIX fiber	+18.7 [-19.2; +55.0]	+20.9 [+10.2; 29.6]	0.616
CD*CSA, $\mu\text{m}^2\cdot\text{mm}^2$	+5.36 [-10.2; +26.2]	+25.5 [+15.1; +111]	<b>0.040</b>
CD*CSA*[Hb], A-U	+2.35 [-7.93; +21.5]	+24.3 [+11.7; +85.6]	0.081

485

## ÉTUDE 2

# ADAPTATIONS STRUCTURALES ET ENERGETIQUES DU TISSU MUSCULAIRE DES PATIENTS DREPANOCYTAIRES EN REPONSE A L'ENTRAINEMENT EN ENDURANCE

*Les bénéfices au niveau de la microvascularisation ayant été démontrés, l'objectif de cette étude était d'analyser les adaptations structurales et énergétiques du tissu musculaire à la suite d'un entraînement en endurance chez ces patients drépanocytaires.*

*Les analyses de cette étude ont été réalisées au sein du Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (LIBM) (Université Jean Monnet à Saint-Etienne et Université Savoie Mont Blanc à Chambéry) et l'Institute of NeuroScience de l'Université Catholique de Louvain en Belgique dans le cadre de la cotutelle de thèse.*

*Cette étude met en évidence les effets bénéfiques de l'entraînement sur la structure et la capacité oxydative musculaires des patients drépanocytaires. En outre, le contenu musculaire des protéines impliquées dans la régulation du pH est demeuré inchangé en réponse à l'entraînement, ce qui renforce le principe d'innocuité de cet entraînement pour ces patients.*

---

### **ARTICLE ASSOCIÉ :**

**Merlet AN**, Messonnier L, Hourde C, Bartolucci P, Schawlm C, Gellen B, Deldicque L, Francaux M, Féasson L.

Muscle structural and energetic benefits of endurance exercise training in sickle cell disease patients.

*Prochainement soumis dans American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.*

---



## **Contexte et objectif**

L'entraînement en endurance d'une durée de 8 semaines et réalisé à une intensité modérée a d'ores et déjà démontré son innocuité chez les patients drépanocytaires adultes ou jeunes (Gellen et al. 2018 ; Liem et al. 2017). Des bénéfices sur l'aptitude à l'exercice chez ces patients (Gellen et al. 2018) ainsi que sur leur microvascularisation musculaire ont également été observés (Merlet et al. étude 1). Puisque ces patients présentent initialement une hypotrophie significative et des capacités oxydatives musculaires altérées, pouvant être associées à une mauvaise qualité de vie (Ravelojaona et al. 2015 ; Merlet et al. 2018), l'objectif de cette étude était donc d'évaluer les effets de ce programme d'entraînement en endurance sur les caractéristiques structurales et énergétiques des muscles striés squelettiques impliqués dans l'activité (pédalage). Nous avons émis les hypothèses qu'un tel programme i) améliorerait leur capacité oxydative musculaire, notamment par l'augmentation des activités enzymatiques de la filière aérobie (cycle de Krebs,  $\beta$ -oxydation et chaîne respiratoire mitochondriale), ii) augmenterait le contenu musculaire en protéines impliquées dans le transport du glucose et du lactate, iii) n'induirait pas de désordres métaboliques et en particulier une acidose conduisant au développement de mécanismes de régulation du pH musculaire et iv) augmenterait potentiellement la surface de section des fibres musculaires.

## **Méthodes**

Afin de répondre aux hypothèses de cette étude, des mesures sur les propriétés structurales du tissu musculaire (surface de section et typologie des fibres) ont été effectuées à partir de techniques histologiques. Des mesures d'activités enzymatiques de différentes enzymes clés du métabolisme énergétique [myokinase (MK), créatine kinase (CK), énoïase (ENO), lactate déshydrogénase (LDH), citrate synthase (CS),  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Déshydrogénase ( $\beta$ -HAD), complexe II (CII) et IV (CIV) de la chaîne respiratoire] ont été réalisées en spectrophotométrie. L'analyse histoenzymatique de l'activité de la cytochrome c oxydase (COx) en fonction du type de fibres a également été réalisée. Des mesures du contenu protéique musculaire des sous-unités des 5 complexes de la chaîne respiratoire, du transporteur de glucose de type 4 (GLUT4) et du lactate (MCT1 et MCT4), ainsi que des protéines impliquées dans la régulation du pH telles que les anhydrases carboniques II (CAII) et III (CAIII) ont également été réalisées par western blot (voir partie matériels et méthodes).

## **Résultats et discussion**

Conformément à notre hypothèse, les résultats de cette étude ont rapporté une augmentation de la surface de section des fibres musculaires en réponse à l'entraînement. Malgré l'intensité très modérée de l'exercice, la surface de section des fibres de type I a significativement augmenté de 7% ( $P < 0,05$ ) par rapport au groupe contrôle, réduisant ainsi

l'hypotrophie retrouvée chez ces patients (hypotrophie similaire à celle préalablement décrite dans Ravelojaona et al. 2015).

Egalement, l'activité des enzymes oxydatives (CS : +28%,  $P < 0,001$ ;  $\beta$ -HAD : +20%,  $P < 0,01$  ; complexe IV de la chaîne respiratoire (CIV) : +31%,  $P < 0,05$  et COx (histoenzymologie) pour les fibres de type I : +11%,  $P < 0,05$  ;) et le contenu protéique musculaire de la plupart des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire [sous-unité du CI (NDUFB8) : +18%,  $P < 0,05$  ; sous-unité du CIII (UQCRC2) : +24%,  $P < 0,01$  ; sous-unité du CIV (MTCO1) : +25%,  $P < 0,01$  ; sous-unité du CV (ATP5A) : +7%,  $P < 0,01$ ] ont augmenté en réponse à cet entraînement. Ainsi, conformément à notre hypothèse, l'entraînement en endurance d'intensité modérée permet une amélioration de la capacité d'oxydation musculaire due à une meilleure utilisation de l'oxygène par les mitochondries et une augmentation de la capacité d'oxydation de l'ATP.

Par ailleurs, les résultats de cette étude ont également montré que le contenu musculaire en protéines GLUT4, CAII, CAIII, MCT1 et MCT4 était resté inchangé à l'issue de l'entraînement. Ainsi, l'absence d'adaptation spécifique des mécanismes de régulation du pH (CAII et CAIII, MCT1 et MCT4) intramusculaire pourrait renforcer l'idée que ce mode d'entraînement semble maintenir les patients drépanocytaires à l'écart du danger et notamment de l'acidose liée à l'exercice intense.

## **Conclusion**

Un entraînement en endurance de 8 semaines réalisé à une intensité modérée améliore les caractéristiques structurales et énergétiques musculaires des patients drépanocytaires.

## Muscle Structural and Energetic Benefits of Endurance Exercise Training in Sickle Cell Disease Patients

Angèle N. Merlet, M.Sc.,<sup>1</sup> Laurent A. Messonnier, Ph.D.,<sup>2</sup> Christophe Hourdé, Ph.D.,<sup>2</sup> Pablo Bartolucci, M.D., Ph.D.,<sup>3,4</sup> Céline Schwalm, Ph.D.,<sup>5</sup> Barnabas Gellen, M.D., Ph.D.,<sup>6,7</sup> Louise Deldicque, Ph.D.,<sup>5</sup> Marc Francaux, Ph.D.,<sup>5</sup> Léonard Féasson, M.D., Ph.D.<sup>1,8</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lyon, UJM-Saint-Etienne, Inter-university Laboratory of Human Movement Sciences, EA7424, F-42023 Saint-Etienne, France

<sup>2</sup> Univ. Savoie Mont Blanc, Inter-university Laboratory of Human Movement Sciences EA7424, F-73000 Chambéry, France

<sup>3</sup> Department of Cardiac Rehabilitation, Henri-Mondor University Hospital, AP-HP, Creteil, France

<sup>4</sup> ELSAN, Polyclinique de Poitiers, France

<sup>5</sup> Institute of Neuroscience, Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

<sup>6</sup> Department of Internal Medicine, Henri Mondor University Hospital-UPEC, AP-HP, Créteil, France

<sup>7</sup> Department of Public Health, Henri Mondor University Hospital-UPEC, AP-HP, Créteil, France

<sup>8</sup> Myology Unit, Referent Center of Rare Neuromuscular Diseases, Euro-NmD, University Hospital of Saint-Etienne, France

### Corresponding Author:

Léonard Féasson,  
Unité de Myologie, Bâtiment IRMIS,  
Campus Santé Innovations, Hôpital Nord,  
42 055 CHU de St Etienne, Cedex 2,  
France  
Email: [leonard.feasson@univ-st-etienne.fr](mailto:leonard.feasson@univ-st-etienne.fr)

### Authors Contributions:

LAM, LF, BG and PB designed and conducted this study. CH, LD, MF and ANM designed the muscle analysis. CS contributed to the technical assistance. ANM did the analysis and wrote the first draft of the article. All authors critically reviewed the draft and approved the final version for publication.

**Sources of Funding:** None.

**Short Title:** Energetic benefits of exercise in sickle cell disease.

**Descriptor number:** 8.13 Exercise in Health & Disease

**Word counts:** Abstract = 251; Text = 2742

## **At a Glance Commentary**

### **Scientific Knowledge on the Subject**

We previously showed that sickle cell disease patients display a significant muscle hypotrophy and an altered muscle oxidative capacity compared to healthy subjects. In a recent study, we highlighted that a moderate-intensity endurance exercise training is safe and beneficial in sickle cell disease patients. The training program significantly improved their functional capacity, especially at exercise intensities close to those needed for activities of daily living.

### **What this study Adds to the Field**

This trial is the first to provide a comprehensive study on the effects of moderate-intensity endurance exercise training program on muscle structural and energetic characteristics in sickle cell disease patients. The training significantly improved surface area of type I muscle fiber, oxidative enzymes activities, and muscle content of respiratory chain complexes. These benefits may explain the improvements in muscle function and exercise tolerance we previously reported in sickle cell disease patients following this training program.

1 **ABSTRACT**

2 **Rationale:** Sickle cell disease patients display a significant hypotrophy and an altered oxidative  
3 capacity of muscle cells, associated with a poor quality of life. Recently, we demonstrated that  
4 a moderate-intensity endurance exercise training program is safe and beneficial for muscle  
5 function of those patients.

6 **Objectives:** The aim of the present study was to evaluate the effects of this training program  
7 on structural and metabolic properties of skeletal muscle in sickle cell disease patients.

8 **Methods:** Forty sickle cell disease patients were randomized in two groups: a trained group  
9 which followed an 8-week moderate-intensity endurance exercise training program and an  
10 untrained control group which maintained its usual lifestyle. A biopsy of the *vastus lateralis*  
11 muscle was obtained before and after the 8-week period.

12 **Measurements and Main Results:** In sickle cell disease patients, endurance exercise training  
13 increased the muscle cross-section area of type I fibers (+7%, p=0.038), the activity of oxidative  
14 enzymes [citrate synthase: +28%, p<0.001;  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase: +20%,  
15 p=0.009; cytochrome c oxidase of type I muscle fiber: +11%, p=0.042; complex IV of the  
16 respiratory chain: +31%, p=0.017] and the muscle content of subunits of complexes I (+18%,  
17 p=0.049), III (+24%, p=0.005), IV (+25%, p=0.003) and V (+7%, p=0.002) of the respiratory  
18 chain while no changes occurred in the control patients. Fiber type distribution and muscle  
19 content of proteins involved in glucose transport and pH regulation remained unchanged in both  
20 groups.

21 **Conclusion:** A moderate-intensity endurance exercise training improves muscle structural and  
22 oxidative capacity and thus partly reverses these deficits commonly observed in sickle cell  
23 disease patients.

24 **Keywords:** Sickle cell anemia, physical activity, exercise, metabolism, acidosis, pH regulation

25 **Word count:** 253 words

## 26 INTRODUCTION

27 Sickle cell disease (SCD) is the most frequent worldwide genetic disease. This  
28 hemoglobinopathy is related to synthesis of an abnormal S hemoglobin (HbS) which once  
29 deoxygenated tends to polymerize, resulting in the sickling of the red blood cell (RBC). Sickle  
30 RBC are less deformable and adhere more to the endothelium (1), leading to their entrapment  
31 into the microcirculation and to subsequent painful vaso-occlusive crises (VOC). VOC can  
32 induce failure of critical organs (2). Sickle RBC are also fragile and break easily causing  
33 hemolysis which, unbalanced by sufficient erythropoiesis, leads to severe chronic anemia (1).  
34 Arterial desaturation is also observed in SCD patients (3, 4). Anemia and arterial desaturation  
35 concurrently induce hypoxemia which concurrently with the microvascular rarefaction  
36 potentially result in lower tissular oxygen supply and ultimately hypoxia (5-7), especially  
37 during exercise for which energy demand is elevated. Skeletal muscle of SCD patients also  
38 display impaired oxidative capacities characterized by a lower citrate synthase (CS),  $\beta$ -  
39 hydroxyacyl-CoA dehydrogenase ( $\beta$ -HAD) and cytochrome c oxidase (COx) activities  
40 compared to healthy subjects (7). These metabolic defects impair adenosine triphosphate (ATP)  
41 production from mitochondria, relying more on the non-oxidative glycolytic pathway to supply  
42 energy, leading to early lactate production and accumulation (8, 9). Finally, skeletal muscle of  
43 SCD patients are also hypotrophic. Taken together, these metabolic and structural alterations  
44 explain the poor muscle function, exercise intolerance and consequently, the low quality of life  
45 of SCD patients (9, 10). Therefore, any strategy/intervention that might reverse these alterations  
46 appears to be useful for the patients.

47 In healthy subjects, it is well established that endurance exercise training is effective to  
48 improve muscle cross-sectional area, oxidative enzyme activities and capability of glucose  
49 transport in the exercised muscle fibers (11-13). Similar results have been reported in  
50 pathological populations like patients suffering from fascioscapulohumeral muscular dystrophy



51 or chronic obstructive pulmonary disease (14, 15). Recently, the feasibility and the safety of a  
52 moderate exercise training program has been demonstrated in SCD children but the benefits for  
53 the patients were not clearly established (16). The training program used in our study, i.e. 8-  
54 week individually-tailored moderate-intensity endurance exercise training has also  
55 demonstrated its safety for adults SCD patients without severe chronic complications as well  
56 as its benefits for their exercise capacity, muscle microvascular density and quality of life (17).  
57 Based on these previous results, we hypothesized that such training program would reduce  
58 muscle hypotrophy, increases muscle oxidative capacity, and muscle content of proteins  
59 involved in glucose transport.

60

## 61 **METHODS**

62

### 63 **Study subjects**

64 Among the 40 adult homozygous SCD patients without severe chronic complications included,  
65 33 (83%) completed this study. Patients baseline characteristics were reported separately (17)  
66 but are repeated here for convenience of the reader: they were similar between groups (Table  
67 1). This study took place in the reference center for major sickle cell syndromes, the cardiac  
68 rehabilitation and the functional and respiratory explorations unit of the Henri Mondor  
69 University Hospitals (APHP) at Créteil (France). The experiment was approved by the ethics  
70 committee and conformed to the standards set by the Declaration of Helsinki for human studies.  
71 The University Hospital of Saint-Etienne was the promoter of this study (ClinicalTrials.gov  
72 NCT02571088). Exclusion criteria and methods are detailed in the online supplement.

73

### 74 **Study design**

75 Included patients were subjected to a biopsy of the *vastus lateralis* muscle performed according  
76 to the percutaneous technique (18). Then, patients were randomly assigned either to a trained  
77 (N=20) or to an untrained control (N=20) group. Subsequently, patients of the trained group  
78 realized a specific 8-week endurance exercise training program while patients of the untrained  
79 control group were asked to maintain their usual lifestyle. The training workload was  
80 determined during a submaximal incremental exercise and corresponds to workload at 2.5-  
81 mmol/liter of blood lactate concentration. Subsequently to this 8-week period, the muscle  
82 biopsy was repeated in both groups.

83

#### 84 **Muscle analysis**

##### 85 Muscle morphology and fiber typing

86 Morphometric analyses and fiber type determination were performed by immunofluorescence  
87 on two serial cross-sections as described by Meunier et al. (19).

##### 88 Histoenzymology

89 COx activity was determined histochemically on serial transverse sections as previously  
90 described (7, 20). The double labeling COx/SDH (succinate dehydrogenase) staining was also  
91 assessed, as described in the online supplement, in order to visualize the muscle fibers with a  
92 mitochondrial dysfunction (blue fiber), i.e., COx-deficient (COx-) but SDH-normal (SDH+).

##### 93 Enzyme activity

94 Maximal activities of myokinase (MK), creatine kinase (CK), enolase (ENO), lactate  
95 dehydrogenase (LDH), CS,  $\beta$ -HAD and second (CII) and fourth (CIV) respiratory chain  
96 complexes (UI/mg of protein) were determined as previously described (21).

##### 97 Western blots

98 Muscle protein content of total oxphos complexes including complex I (CI) subunit NDUFB8,  
99 CII subunit SDHB, complex III (CIII) subunit UQCRC2, CIV subunit MTCO1 and complex V

100 (CV) subunit ATP5A, glucose transporter type 4 (GLUT4), carbonic anhydrase II (CAII),  
101 carbonic anhydrase III (CAIII), monocarboxylate transporter 1 (MCT1) and monocarboxylate  
102 transporter 4 (MCT4) was assessed as described in the online supplement.

103

#### 104 **Statistics**

105 Descriptive results are presented as means (standard error of the mean (SEM)) or medians  
106 [inter-quartile range (IQR)] for continuous variables, and as numbers  $\pm$  % for categorical  
107 variables. For continuous variables, the relative mean change between groups (untrained *vs*  
108 trained) was assessed using T-tests for independent groups or Mann-Whitney tests depending  
109 on the normality of the variable's distributions, obtained with the Shapiro-Wilk test for  
110 normality. The critical level for statistical significance was set at 5%. Analysis were computed  
111 with Statistica 8 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Because of the poor quality of some muscle  
112 biopsies or extracted samples, data of some patients could not be taken into account.  
113 Consequently, histologic, enzymatic and protein analyses rely on 15 to 17 untrained and to 14  
114 to 15 trained patients

115

#### 116 **RESULTS**

117 A few results (CS, type I fiber and COx) already presented (17) were repeated here for the  
118 convenience of the reader.

119 At baseline, no significant between-group differences were found for muscle structural and  
120 energetic characteristics (Table 1).

121

#### 122 **Muscle fiber characteristics**

123 No changes were observed in the muscle fiber type distribution and in the cross-sectional area  
124 between groups (Figure 1B). The per fiber-type analysis showed that the change in the muscle

125 cross-section area of type I fibers slightly increased in the trained group compared to the  
126 untrained control group for which it tends to decrease (+7%,  $p=0.038$ ; Figure 1B). Muscle  
127 cross-sectional surface area of type IIA and IIX remained unchanged and did not differ between  
128 groups.

129

### 130 **Muscle enzymes activities**

131 At baseline, 15 (47%) of 32 SCD patients (8 in the untrained control and 7 in the trained groups)  
132 displayed some muscle fibers with COx-/SDH+, i.e., blue fibers (Figure 2A). No changes and  
133 differences between groups were observed for MK, CK, ENO, LDH and CII activities.  
134 However,  $\beta$ -HAD, CS and CIV activities were increased in the trained group compared to the  
135 untrained control group (+20%,  $p=0.009$ ; +28%,  $p<0.001$ ; +31%,  $p=0.017$ , respectively; Figure  
136 2B). In addition, COx activity increased in the trained group compared to the untrained control  
137 group in type I muscle fibers but not in the other fiber types (+11%,  $p=0.042$ ; Figure 1C). The  
138 change in CIV/CII activity ratio was increased in the trained group compared to the untrained  
139 control group (+38%,  $p=0.026$ ; Figure 2B).

140

### 141 **Muscle protein content of respiratory chain complexes**

142 The muscle protein content of CI, CIII, CIV and CV subunits of the respiratory chain was  
143 increased in the trained group compared to the untrained control group (+18%  $p=0.049$ ; +24%,  
144  $p=0.005$ ; +25%,  $p=0.003$ ; +7%,  $p=0.002$ , respectively). No changes were reported for the  
145 muscle protein content of CII subunit and CIV/CII subunits ratio (Figure 2C-D).

146

### 147 **Muscle content of proteins involved in muscle glucose transport and pH regulation**

148 Muscle content of GLUT4 and proteins involved in pH regulation (CAII, CAIII, MCT1 and  
149 MCT4) remained unchanged between groups (Figure 3A-D).

150

## 151 **DISCUSSION**

152 The present study was the first clinical randomized controlled trial evaluating the impact of an  
153 8-week individualized moderate-intensity endurance exercise training program on muscle  
154 structural and energetic characteristics in SCD patients. The main findings were that endurance  
155 exercise training i) increased the surface area of type I muscle fibers, ii) improved activities  
156 and/or content of the muscle oxidative enzymes, iii) did not alter muscle content of proteins  
157 involved in pH regulation. Together, these results confirmed our hypothesis that moderate-  
158 intensity endurance exercise training is beneficial for muscle morphology and energetics, that  
159 takes part in the improvement of physical ability and quality of SCD patients (17). In addition,  
160 no specific adaptations of mechanisms of muscle pH regulation were observed suggesting that  
161 muscle pH was not challenged during this study. Therefore, it seems that the present endurance  
162 training protocol i) did not challenge the patients' muscle acid/base status and ii) is safe for  
163 SCD patients without severe chronic complications (17).

164

### 165 **Endurance exercise training improves muscle structural characteristics of SCD patients**

166 At baseline, fiber type distribution and mean cross-section areas of our French SCD patients  
167 were similar with those obtained in stable conditions (at distance from any VOC) by  
168 Ravelojaona et al. (7) in Cameroonians SCD patients. Following 8 weeks of a moderate-  
169 intensity endurance exercise training program, our results highlighted a slight increase muscle  
170 cross-section area of type I fibers in trained patients. These results suggest that the hypotrophy  
171 previously reported in SCD patients (7) appears mildly dampened following the training  
172 program. The lack of adaptation in the other fiber types can be explained by the type I fibers  
173 preferential recruitment during moderate-intensity endurance exercise training. These findings  
174 were in agreement with several studies demonstrating the potential of endurance exercise

175 training to increase muscle fiber surface area in healthy and pathological populations (11, 14,  
176 15).

177

### 178 **Endurance exercise training improves muscle oxidative capacity**

179 SCD is associated with altered muscle oxidative capacity compared to healthy subjects, i.e.,  
180 low  $\beta$ -HAD (fatty acid beta-oxidation), CS (Krebs cycle), and COx (respiratory chain) activities  
181 (7). In the present study, the COx/SDH histochemical analyses revealed that 47% of SCD  
182 patients, generally the oldest ones (39 *versus* 30 years old;  $p < 0.01$ , data not shown), displayed  
183 at baseline some COx-deficient but SDH-normal muscle fibers. This finding was usually  
184 observed in human aging (23) and in a variety of clinical conditions (24-26) and indicates a  
185 mitochondrial dysfunction (27). Therefore, this result is an additional argument for altered  
186 muscle oxidative capacity in SCD patients and that can play a key role in their exercise  
187 intolerance (7, 22).

188       After 8 weeks of a moderate-intensity endurance exercise training, SCD patients  
189 displayed a better muscle oxidative capacity, which is very beneficial for them. Indeed, an  
190 increase in the activity of key enzymes of oxidative metabolism (CS,  $\beta$ -HAD, CIV) were  
191 reported in trained SCD patients. The per-fiber type analysis showed an increase of COx  
192 activity following the training program for the fibers specifically used during endurance training  
193 namely the type I. In addition, an increase of muscle protein content of CI, CIII, CIV and CV  
194 subunits of the respiratory chain. The better post-training CS activity may be associated with  
195 increase muscle mitochondrial volume density, as shown the strong correlation between both  
196 parameters found in healthy subject following an endurance exercise training (28). We can  
197 therefore hypothesize that our training program could stimulates mitochondrial biogenesis in  
198 SCD patients. In addition, the lack of change in the anaerobic enzymes activities (MK, CK,  
199 LDH and ENO) following the training program indicates that muscle energetic metabolism of

200 SCD trained patients rely more on oxygen-derived pathways, as observed in previous reports  
201 conducted in healthy subjects (29) and in SCD mice (30). The strong increase of  $\beta$ -HAD/ENO  
202 (+28%,  $p<0.001$ ), CS/ENO (+35%,  $p=0.006$ ) and CIV/ENO (+37%,  $p=0.008$ ) enzyme activity  
203 ratios in trained SCD patients compared to untrained controls (data not shown) also strength  
204 this assumption.

205 Interestingly, the lack of change of CII activity and content compared to increased CIV  
206 activity and content of the respiratory chain after the training program may indicate that CII  
207 was upregulated in SCD patients. Thus, these results suppose that such training reduce the CIV  
208 activity deficit previously observed, and involve a respiratory chain readjustment. The strong  
209 increase of the CIV/CII enzyme activity ratio in trained patients could reinforce this idea,  
210 however further analyses are needed to confirm this assumption.

211 Taken together, these results highlighted an improve muscle oxidative capacity in SCD  
212 patients following the training program and may explain, at least partially, their functional  
213 improvements previously reported, e.g., the increase of the workload at 4-mmol/liter of blood  
214 lactate concentration or at the first lactate threshold, as well as the lesser lactate accumulation  
215 for a given workload (17). The better post-training muscle oxidative capacity may also result  
216 from an improved oxygen supply in relation to denser capillary network (17).

217

### 218 **Endurance exercise training did not modify muscle proteins content involved in glucose** 219 **transport or pH regulation**

220 Conversely to our hypothesis, endurance exercise training did not change GLUT4 muscle  
221 protein content, the main glucose transporter in human skeletal muscle. Although it is well  
222 known that endurance training-induced increase of the glucose transporter expression facilitates  
223 the blood glucose entry into the muscle fiber (13), the low workload intensity used in the present  
224 study may explain the lack of change in GLUT4 muscle protein content.



225 In addition, our data highlighted that endurance exercise training did not modify the  
226 muscle protein content of CAII, CAIII, MCT1 and MCT4 which participate to the line of  
227 defense against muscle acid/base disturbances. Indeed, during exercise, all these proteins are  
228 directly involved in regulation of intramuscular pH (13). Myocellular pH is tightly regulated by  
229 bicarbonate-related intramuscular H<sup>+</sup> buffering mechanisms which are depend on CAII and  
230 CAIII activities as well as on specific transporters facilitating the H<sup>+</sup> extrusion from the  
231 myocytes via MCT1 and MCT4. Several studies have demonstrated that high-intensity exercise  
232 challenges myocellular pH and that high-intensity training sessions lead to muscle adaptations  
233 improving myocellular pH regulation via increases in muscle CAs and MCT protein content  
234 (31, 32). The lack of change in CA and MCT in the present study suggests that the training  
235 sessions did not lead to specific adaptations in the muscle pH regulation mechanisms.  
236 Therefore, these findings tended to validate our training program strategy, which was based on  
237 the aim to not disturb the acid/base balance during exercise. Indeed, these assumptions suppose  
238 that the glycolysis pathway related to the blood acidosis and lactate accumulation was only  
239 slightly involved (33).

240 As a whole, the lack of change in muscle content of proteins involved in pH regulation  
241 in response to the proposed endurance training program argue in favor of the safety of such  
242 training program for SCD patients.

243

#### 244 **Clinical implications**

245 This study demonstrated relevant benefits of a moderate-intensity endurance exercise training  
246 program in SCD patients. Indeed, the hypertrophy and the altered oxidative capacity previously  
247 reported in these patients (7) seemed partially counteracted by the proposed training regimen.  
248 Based on previous (17) and the present findings, such an intervention appears to improve  
249 muscle structural and energetic characteristics, muscle function, physical ability, exercise

250 tolerance and quality of life of SCD patients. Further research is needed to assess the long-term  
251 effects and sustainability of training benefits in a larger cohort of patients.

252

253 In conclusion, the present study showed for the first time the beneficial effects of 8-week  
254 moderate-intensity endurance exercise training on skeletal muscle and energetic characteristics  
255 of SCD patients without severe chronic complications. These benefits included an increase in  
256 the muscle surface area of type I, in the oxidative enzyme activities and in the content of the  
257 respiratory chain. These findings demonstrated an improved muscle oxidative capacity, which  
258 is highly beneficial for SCD patients. Besides, the lack of change observed in the glucose  
259 transport and pH regulation mechanisms suggest that the glycolysis pathway, related to  
260 intracellular acidosis, was not or only barely involved during the training. This latter finding  
261 demonstrated the safety of this mode of training in SCD patients. Thus, endurance exercise  
262 training appears to be of great interest given the muscle and energetic improvement highlighted  
263 in the present study.

264

## 265 **Acknowledgments**

266 We thank John Temesi for editorial assistance. We thank Marie-Pierre Blanc, Dominique  
267 Gouttefangeas and Marion Ravelojaona (Myology Unit, Referent Center of Rare  
268 Neuromuscular Diseases, Euro-NmD, University Hospital of Saint-Etienne, France) for  
269 technical assistance.

270

271 **REFERENCES**

- 272 1. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sick cell Disease. *N Engl J Med* 2017;377: 305.
- 273 2. Gladwin MT, Sachdev V. Cardiovascular abnormalities in sickle cell disease. *J Am Coll*  
274 *Cardiol* 2012;59:1123-33.
- 275 3. Quinn CT, Sargent JW. Daytime steady-state haemoglobin desaturation is a risk factor  
276 for overt stroke in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 2008;140:336-9.
- 277 4. Setty BN, Stuart MJ, Dampier C, Brodecki D, Allen JL. Hypoxaemia in sickle cell  
278 disease: biomarker modulation and relevance to pathophysiology. *Lancet*  
279 2003;362:1450-5.
- 280 5. Nahavandi M, Tavakkoli F, Hasan SP, Wyche MQ, Castro O. Cerebral oximetry in  
281 patients with sickle cell disease. *Eur J Clin Invest* 2004;34:143-8.
- 282 6. Nahavandi M, Nichols JP, Hassan M, Gandjbakhche A, Kato GJ. Near-infrared spectra  
283 absorbance of blood from sickle cell patients and normal individuals. *Hematology*  
284 2009;14:46-8.
- 285 7. Ravelojaona M, Féasson L, Oyono-Enguélé S, Vincent L, Djoubairou B, Ewa'Sama  
286 Essoue C, Messonnier LA. Evidence for a profound remodeling of skeletal muscle and  
287 its microvasculature in sickle cell anemia. *Am J Pathol* 2015;185:1448-56.
- 288 8. Miller GJ, Serjeant GR, Sivapragasam S, Petch MC. Cardio-pulmonary responses and  
289 gas exchange during exercise in adults with homozygous sickle-cell disease (sickle-cell  
290 anaemia). *Clin Sci* 1973;44:113-28.
- 291 9. Callahan LA, Woods KF, Mensah GA, Ramsey LT, Barbeau P, Gutin B.  
292 Cardiopulmonary responses to exercise in women with sickle cell anemia. *Am J Respir*  
293 *Crit Care Med* 2002;165:1309-16.

- 294 10. Ameringer S, Elswick RK Jr, Smith W. Fatigue in adolescents and young adults with  
295 sickle cell disease: biological and behavioral correlates and health-related quality of life.  
296 *J Pediatr Oncol Nurs* 2014;31:6-17.
- 297 11. Messonnier L, Freund H, Féasson L, Prieur F, Castells J, Denis C, Linossier MT,  
298 Geysant A, Lacour JR. Blood lactate exchange and removal abilities after relative high-  
299 intensity exercise: effects of training in normoxia and hypoxia. *Eur J Appl Physiol*  
300 2001;84:403-12.
- 301 12. Messonnier L, Freund H, Denis C, Féasson L, Lacour JR. Effects of training on lactate  
302 kinetics parameters and their influence on short high-intensity exercise performance. *Int*  
303 *J Sports Med* 2006;27:60-6.
- 304 13. Juel C. Training-induced changes in membrane transport proteins of human skeletal  
305 muscle. *Eur J Appl Physiol* 2006;96:627-35.
- 306 14. Bankolé LC, Millet GY, Temesi J, Bachasson D, Ravelojaona M, Wuyam B, Verges S,  
307 Ponsot E, Antoine JC, Kadi F, Féasson L. Safety and efficacy of a 6-month home-based  
308 exercise program in patients with facioscapulohumeral muscular dystrophy: A  
309 randomized controlled trial. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e4497.
- 310 15. Maltais F, LeBlanc P, Simard C, Jobin J, Bérubé C, Bruneau J, Carrier L, Belleau R.  
311 Skeletal muscle adaptation to endurance-exercise training in patients with chronic  
312 obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:442-7.
- 313 16. Liem RI, Akinosun M, Muntz DS, Thompson AA. Feasibility and safety of home  
314 exercise training in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer* 2017;64.
- 315 17. Gellen B, Messonnier LA, Galactéros F, et al. Moderate-intensity endurance-exercise  
316 training in sickle-cell disease patients without severe chronic complications: a  
317 randomized-controlled trial. *Lancet Haematol* 2018.

- 318 18. Henriksson KG. "Semi-open" muscle biopsy technique. A simple outpatient procedure.  
319 *Acta Neurol Scand* 1979; **59**: 317-23.
- 320 19. Meunier B, Picard B, Astruc T, Labas R. Development of image analysis tool for the  
321 classification of muscle fibre type using immunohistochemical staining. *Histochem Cell*  
322 *Biol* 2010;134:307-17.
- 323 20. Vincent L, Féasson L, Oyono-Enguéllé S, Banimbek V, Monchanin G, Dohbobga M,  
324 Wouassi D, Martin C, Gozal D, Geysant A, Thiriet P, Denis C, Messonnier L. Skeletal  
325 muscle structural and energetic characteristics in subjects with sickle cell trait, alpha-  
326 thalassemia, or dual hemoglobinopathy. *J Appl Physiol (1985)* 2010;109:728-34.
- 327 21. Lowry OH, Passonneau JV. A Flexible System of Enzymatic Analysis. New York:  
328 Academic Press; 1972.
- 329 22. Merlet AN, Chatel B, Hourdé C, Ravelojaona M, Bendahan D, Féasson L, Messonnier  
330 LA. How Sickle Cell Disease Impairs Skeletal Muscle Function: Implications in Daily  
331 Life. *Med Sci Sports Exerc* 2018
- 332 23. Brierley EJ, Johnson MA, Lightowers RN, James OF, Turnbull DM. Role of  
333 mitochondrial DNA mutations in human aging: implications for the central nervous  
334 system and muscle. *Ann Neurol* 1998 Feb;43:217-23.
- 335 24. Zierz CM, Joshi PR, Zierz S. Frequencies of myohistological mitochondrial changes in  
336 patients with mitochondrial DNA deletions and the common m.3243A>G point  
337 mutation. *Neuropathology* 2015;35:130-6.
- 338 25. Konokhova Y, Spendiff S, Jagoe RT, Aare S, Kapchinsky S, MacMillan NJ, Rozakis P,  
339 Picard M, Aubertin-Leheudre M, Pion CH, Bourbeau J, Hepple RT, Taivassalo T. Failed  
340 upregulation of TFAM protein and mitochondrial DNA in oxidatively deficient fibers  
341 of chronic obstructive pulmonary disease locomotor muscle. *Skelet Muscle* 2016;6:10.

- 342 26. Bua E, Johnson J, Herbst A, DeLong B, McKenzie D, Salamat S, Aiken JM.  
343 Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels  
344 in aged human skeletal muscle fibers. *Am J Hum Genet* 2006;79:469-80.
- 345 27. Greaves LC, Reeve AK, Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA and disease. *J*  
346 *Pathol* 2012;226:274-86.
- 347 28. Meinild Lundby AK, Jacobs RA, Gehrig S, de Leur J, Hauser M, Bonne TC, Flück D,  
348 Dandanell S, Kirk N, Kaech A, Ziegler U, Larsen S, Lundby C. Exercise training  
349 increases skeletal muscle mitochondrial volume density by enlargement of existing  
350 mitochondria and not de novo biogenesis. *Acta Physiol (Oxf)* 2018;222.
- 351 29. Gollnick PD. Metabolism of substrates: energy substrate metabolism during exercise  
352 and as modified by training. *Fed Proc* 1985;44:353-7.
- 353 30. Chatel B, Messonnier LA, Barge Q, Vilmen C, Noirez P, Bernard M, Pialoux V,  
354 Bendahan D. Endurance-exercise training reduces exercise-induced acidosis and  
355 improves muscle function in a mouse model of sickle cell disease. *Mol Genet Metab*  
356 2018;123:400-410.
- 357 31. Juel C, Klarskov C, Nielsen JJ, Krstrup P, Mohr M, Bangsbo J. Effect of high-intensity  
358 intermittent training on lactate and H<sup>+</sup> release from human skeletal muscle. *Am J*  
359 *Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E245-51.
- 360 32. Juel C, Holten MK, Dela F. Effects of strength training on muscle lactate release and  
361 MCT1 and MCT4 content in healthy and type 2 diabetic humans. *J Physiol*  
362 2004;556:297-304.
- 363 33. Lindinger MI, Kowalchuk JM, Heigenhauser GJ. Applying physicochemical principles  
364 to skeletal muscle acid-base status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*  
365 2005;289:R891-4.
- 366

367 **FIGURE LEGENDS**

368

369 **Figure 1: Effects of endurance exercise training (mean percentage change) on muscle area**  
370 **and COx activity at fiber type level in trained patients compared with untrained controls**

371 (A) Representative images of serial cross-sections labeled for either MHC-I or MHC-IIA. MHC  
372 labeling (red) was counter-stained for laminin- $\alpha$ 1 (green) and used to determine fiber type in  
373 untrained and trained groups. Percentage change in fiber cross-sectional area (B), and fiber COx  
374 activity (C). Values are expressed as percentages of values measured before training (SEM).  
375 SEM, standard error of the mean; COx, cytochrome c oxidase. \*  $P < 0.05$  for differences between  
376 groups. Scale bar 100  $\mu$ m.

377

378 **Figure 2: Effects of endurance exercise training (mean percentage change) in enzymatic**  
379 **activity and respiratory chain muscle protein content in trained patients compared with**  
380 **untrained controls**

381 (A) Representative images of serial cross-sections with COx (*above*) and COx/SDH staining  
382 (*below*). Percentage change in enzymatic activities(B). (C) representative western blot and (D)  
383 the expression of the 5 subunits of respiratory chain complexes. Specific signals were  
384 normalized against total loaded protein visualized by Coomassie blue staining. Values are  
385 expressed as percentages of values measured before training (SEM). SEM, standard error of the  
386 mean; COx, cytochrome c oxidase; SDH, succinate dehydrogenase; MK, myokinase; CK,  
387 creatine kinase; ENO, enolase, LDH, lactate dehydrogenase;  $\beta$ -HAD,  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA  
388 dehydrogenase; CS, citrate synthase; NDUFB8, SDHB, UQCRC2, MTCO1 and ATP5A,  
389 subunits of complex I, II, III, IV and V of the respiratory chain respectively. \*  $P < 0.05$ , \*\*  
390  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.01$  for differences between groups. Scale bar 50  $\mu$ m.

391

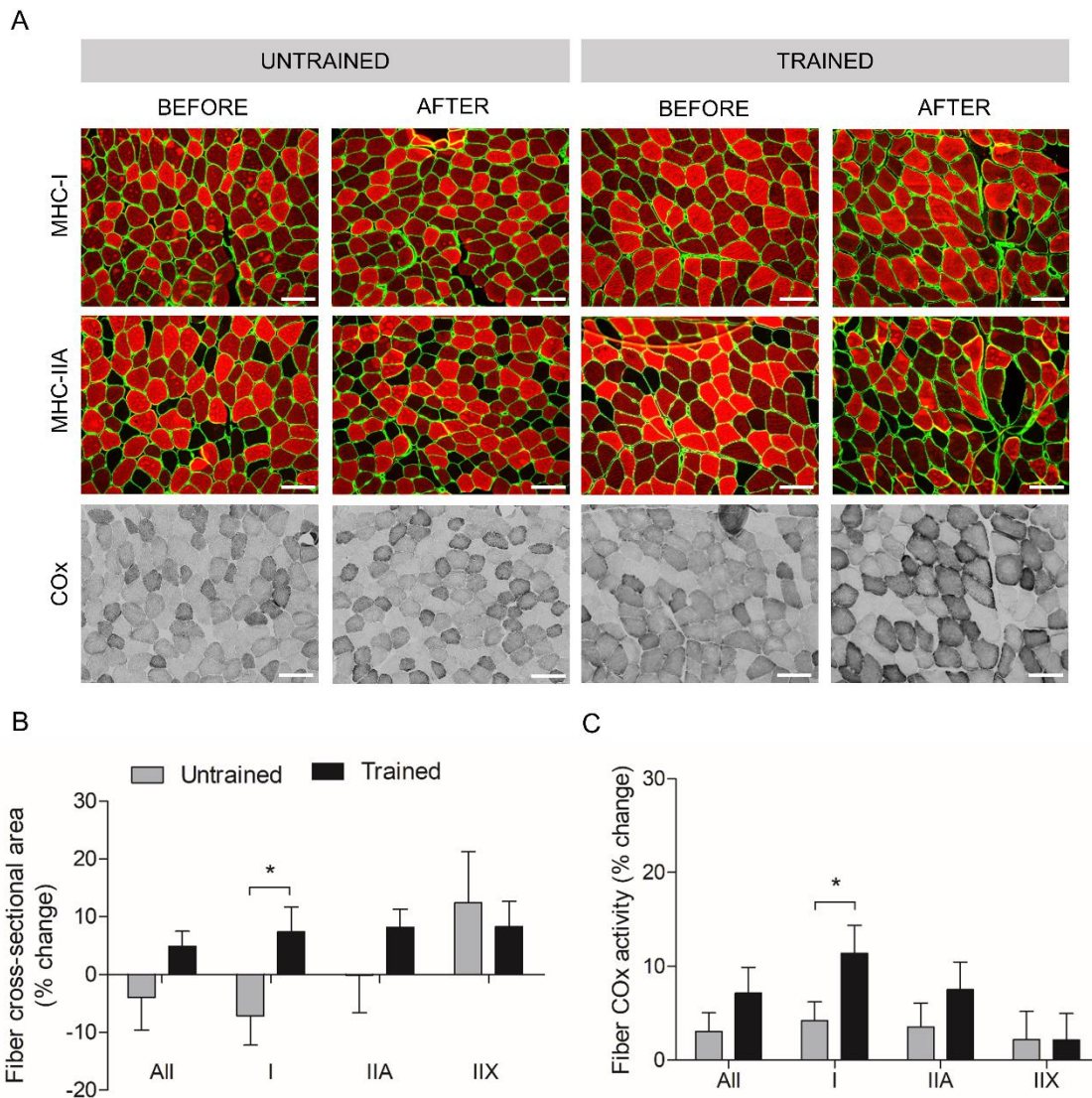


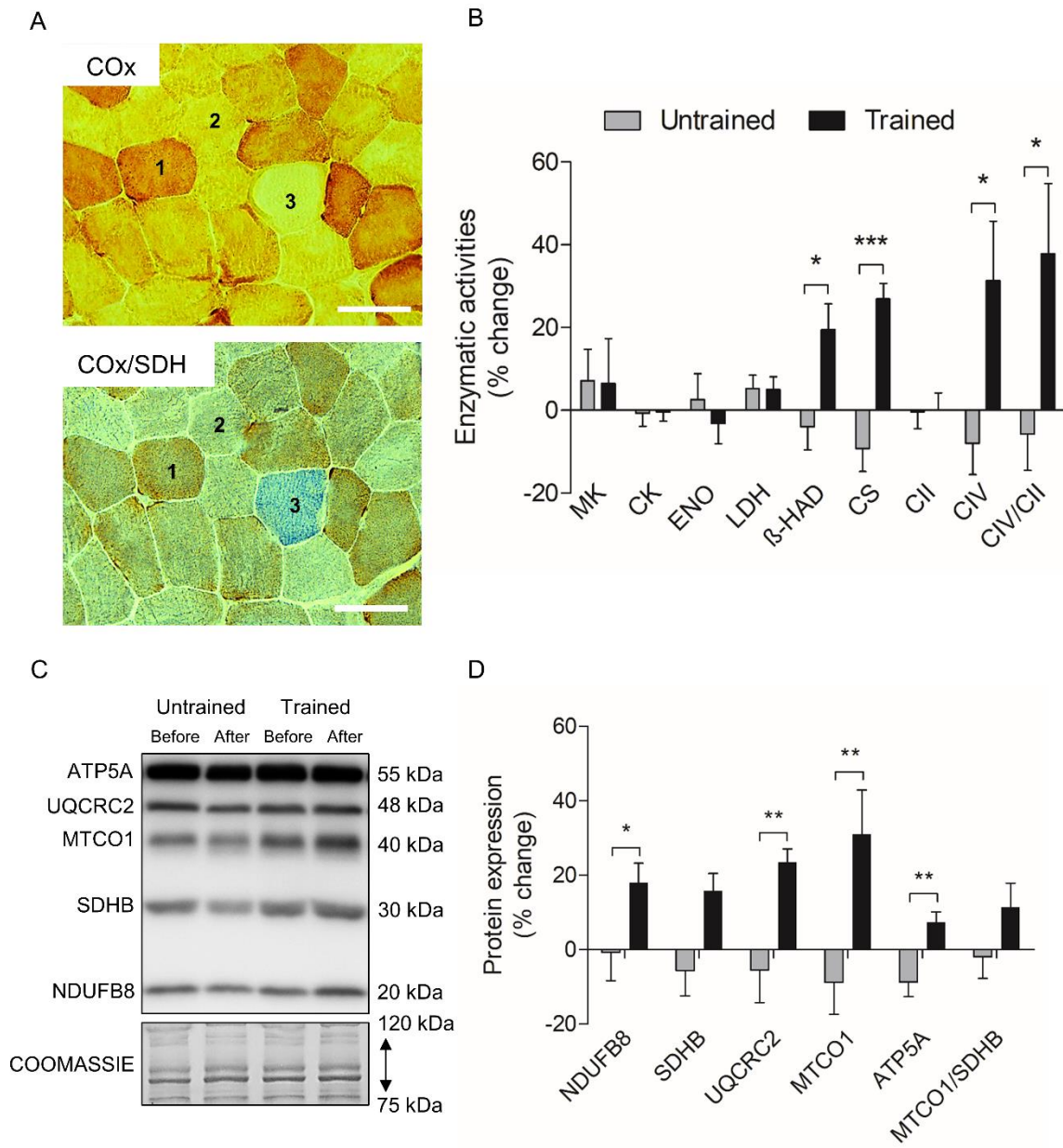
392 **Figure 3: Effects of endurance exercise training (mean percentage change) in muscle**  
393 **content of proteins involved in pH regulation in trained patients compared with untrained**  
394 **controls**

395 **(A, C)** Representative western blot and **(B, D)** the expression of the proteins involved in pH  
396 regulation. Specific signals were normalized against total loaded protein visualized by  
397 Coomassie blue staining. Values are expressed as percentages of values measured before  
398 training (SEM). SEM, standard error of the mean; GLUT4, glucose transporter type 4; CAII,  
399 anhydrase carbonic II, CAIII anhydrase carbonic III, MCT1, monocarboxylate transporter 1;  
400 MCT4, monocarboxylate transporter 4.

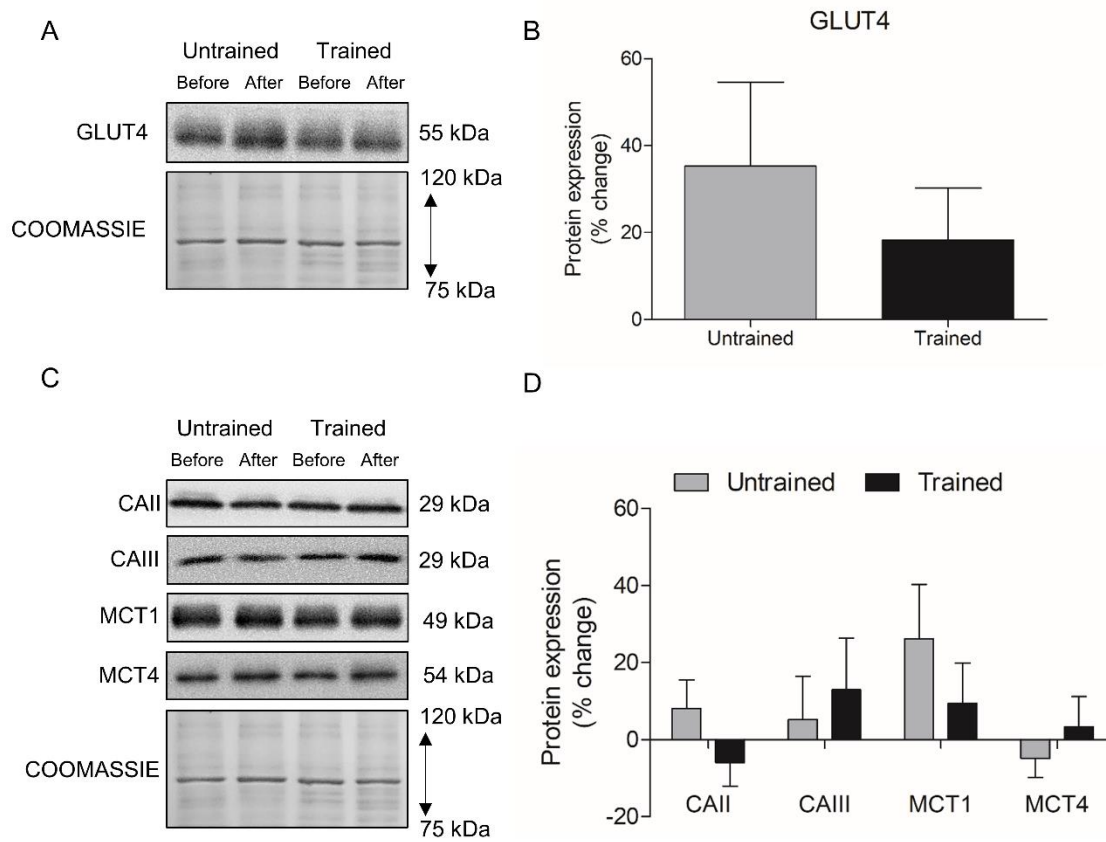
401

402





**Figure 3**



1 **Table 1: Baseline muscle structural and energetic characteristics of untrained and trained**  
 2 **patients with SCD.**

3  
4

Variables	All	Untrained patients	Trained patients	p value
<b>Demographic, hemoglobinic and hematological data</b>				
Age, years	34.1 (9.86)	33.6 (9.00)	34.7 (11.1)	0.738
Male sex, no. %	18±54.5	10±55.6	8±53.3	0.898
BMI, kg/m <sup>2</sup>	22.0 (2.68)	22.2 (2.70)	21.8 (2.75)	0.682
Hemoglobin, g/dl	9.2 [8.3; 9.7]	9.20 [8.20; 9.70]	9.3 [8.6; 10.4]	0.677
Hematocrit, %	27.4 (4.13)	27.9 (3.69)	26.8 (4.66)	0.253
Hemoglobin S, %	83.4 [76.3; 87.8]	84.8 [76.1; 88.6]	80.3 [77.3; 87.3]	0.518
Hemoglobin F, %	5.20 [2.90; 11.3]	5.15 [2.98; 6.90]	5.90 [3.15; 12.0]	0.459
<b>Muscle structural and energetic characteristics</b>				
<b>Fiber type distribution, %</b>				
Type I Fibers	37.0 [29.2; 45.4]	37.9 [28.8; 44.0]	36.6 [29.8; 53.6]	0.955
Type I-IIA Fibers	0.00 [0.00; 0.61]	0.00 [0.00; 1.13]	0.00 [0.00; 0.46]	0.509
Type IIA Fibers	41.2 [35.9; 46.1]	38.6 [32.9; 47.9]	41.5 [39.1; 44.7]	0.806
Type IIA-IIIX Fibers	9.01 [7.38; 11.1]	8.55 [6.35; 10.8]	9.49 [7.41; 13.4]	0.282
Type IIX Fibers	8.41 [4.39; 18.9]	8.18 [6.42; 20.0]	10.2 [1.67; 17.9]	0.266
<b>Muscle cross-sectional area, μm<sup>2</sup></b>				
All	3,293 (155)	3,214 (216)	3,384 (226)	0.591
Type I Fibers	3,423 [2,855; 4,548]	3,325 [2,949; 4,263]	3,862 [2,855; 4,617]	0.439
Type IIA Fibers	3,207 (181)	3,264 (252)	3,141 (269)	0.741
Type IIX Fibers	2,567 (139)	2,419 (177)	2,745 (217)	0.249
<b>Fibers COx activity, A.U</b>				
All	97.3 (1.90)	96.6 (2.57)	98.1 (2.89)	0.692
Type I Fibers	113 (2.29)	114 (3.27)	113 (3.31)	0.788
Type IIA Fibers	92.6 (2.10)	92.4 (3.34)	92.7 (2.52)	0.940
Type IIX Fibers	79.5 (1.54)	79.1 (2.29)	80.0 (2.08)	0.796
<b>Patients with fibers COx-/SDH+, no %</b>				
COx-/SDH+	15±46.9	8±47.1	7±46.7	
<b>Enzyme activity, UI/mg</b>				
MK	1.55 (0.09)	1.58 (0.11)	1.52 (0.14)	0.724
CK	10.5 [10.1; 11.0]	10.6 [10.1; 11.0]	10.4 [9.51; 11.0]	0.751
ENO	0.67 (0.07)	1.66 (0.09)	1.68 (0.12)	0.879
LDH	0.42 (0.01)	0.42 (0.01)	0.44 (0.01)	0.754
β-HAD	0.17 [0.15; 0.20]	0.17 [0.15; 0.20]	0.17 [0.14; 0.18]	0.266
CS	0.045 (0.002)	0.048 (0.004)	0.042 (0.003)	0.172
CII	0.35 (0.01)	0.35 (0.01)	0.35 (0.02)	0.684
CIV	0.027 (0.001)	0.030 (0.002)	0.023 (0.002)	0.513
CIV/CII	0.081 [0.059; 0.102]	0.085 [0.069; 0.100]	0.063 [0.050; 0.089]	0.069
<b>Protein expression, A.U</b>				
NDUFB8	1.12 (0.06)	1.17 (0.09)	1.06 (0.08)	0.372
SDHB	1.40 [1.19; 1.61]	1.49 [1.27; 1.71]	1.26 [1.08; 1.54]	0.221
UQCRC2	1.11 (0.06)	1.14 (0.08)	1.07 (0.09)	0.558
MTCO1	2.10 (0.13)	2.17 (0.18)	2.02 (0.19)	0.561
ATP5A	1.93 (0.09)	2.01 (0.13)	1.78 (0.13)	0.403
MTCO1/SDHB	1.47 (0.06)	1.46 (0.09)	1.47 (0.08)	0.929
GLUT4	2.07 (0.12)	2.05 (0.17)	2.10 (0.18)	0.847
CAII	2.07 [1.70; 2.51]	1.82 [1.69; 2.19]	2.34 [1.89; 3.90]	0.067
CAIII	1.85 [1.38; 2.96]	1.64 [1.37; 2.61]	2.09 [1.63; 3.16]	0.358
MCT1	2.28 [1.87; 3.40]	2.54 [1.97; 3.01]	2.00 [1.90; 3.52]	0.930
MCT4	2.14 (0.09)	2.16 (0.13)	2.11 (0.12)	0.781

5 Results are expressed as mean (SEM), n±% or median [IQR]. SEM, standard error of the mean;  
 6 BMI, body mass index; COx, cytochrome c oxidase; MK, myokinase; CK, creatine kinase;  
 7 ENO, enolase; LDH, lactate dehydrogenase; CS, citrate synthase; β-HAD, β-Hydroxyacyl-CoA  
 8 dehydrogenase; NDUFB8, SDHB, UQCRC2, MTCO1 and ATP5A, subunits of complex I, II,

9 III, IV and V of the respiratory chain respectively; GLUT4, glucose transporter type 4; CAII,  
10 anhydrase carbonic II, CAIII, anhydrase carbonic III, MCT1, monocarboxylate transporter 1;  
11 MCT4, monocarboxylate transporter 4.

12

13

14

15

## Supplementary material

16

17

### 18 **Exclusion criteria**

19 Were excluded from the study the patients i) suffering from a vaso-occlusive episode in the six  
20 weeks preceding the protocol, ii) transfused for less than 3 months, iii) with AIDS, iv) with  
21 illness particularly unresolved inflammatory illness for less than a month, v) with any other  
22 hemoglobinopathy than SCD, vi) with cardiac arrhythmia, vii) holding a pacemaker, viii) with  
23 cardiac antiarrhythmic therapy or medical treatment modifying the activity of the ANS: beta-  
24 blockers, sympathomimetic, atropine, ix) with type I or II diabetes, x) with morbid obesity (BMI  
25 above 35), xi) pregnant, postpartum or breastfeeding, or xii) not compliant the inclusion criteria,

26

### 27 **Muscle biopsies**

28 Muscle biopsies were obtained from the *vastus lateralis* according to the percutaneous  
29 technique. After shaving, asepsis was obtained using alcohol and iso-Betadine 10% (MEDA  
30 Pharma, Paris, France). Then, a local anesthesia of cutaneous and subcutaneous tissues was  
31 performed (2% lidocaine, AstraZeneca, Rueil-Malmaison, France), without cutting the  
32 muscular aponeurosis. A small incision (not exceeding 8 mm) was made through which the  
33 Weil-Blakesley forceps (Lawton, Tittlingen, Germany) was introduced in the subjacent muscle,  
34 and the sample extracted (approximately 150 to 200 mg). Hemostasis was then ensured by 5  
35 min compression, and the access closed by sterile strips. Part of the biopsy sample containing  
36 well identified fascicles were oriented under a stereo microscope and mounted in Cryomount®  
37 (Histolab, Göteborg, Sweden), then frozen in isopentane (Chevron Phillips Chemicals  
38 International, Overijse, Belgium) and finally stored in liquid nitrogen until histochemical and  
39 immunohistochemical analyses. The remainder of the samples (frozen and stored in liquid  
40 nitrogen) was dedicated to biochemical analyses.



41

## 42 **Endurance exercise training protocol**

43 Patients in the trained group performed a physical activity program (moderate-intensity  
44 endurance-exercise training) comprised of 24 exercise sessions on a cycle ergometer (3 sessions  
45 a week for 8 weeks). Each session consisted of: i) an initial warm-up (5 min at 70% of the  
46 training workload), ii) a constant-load endurance exercise (30 min at 100% of the training  
47 workload), iii) cool-down (5 min at 70% of the training workload), and then iv) light stretching  
48 (5 min). Particular attention was paid to the appropriate hydration of patients during each  
49 session by encouraging patients to drink regularly and by providing them water *ad libitum*.  
50 During each exercise session, a physician was present for the clinical observation of patients.  
51 Blood pressure, transcutaneous oxygen saturation and blood-lactate concentration were  
52 measured, and self-perceived exertion rated during each session. If necessary, the exercise  
53 workload was modified between sessions so that blood lactate concentrations during the  
54 training sessions approximately matched the target of 2.5 mmol/liter.

55

## 56 **Muscle morphology and fiber typing**

57 Morphometric analyses and fiber type determination were performed by immunofluorescence  
58 on two serial cross-sections. Anti-laminin- $\alpha 1$  (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) was  
59 conjugated to Alexa-Fluor 488 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) to identify the  
60 extracellular matrix. Additionally, monoclonal antibodies against myosin heavy chain-I (MHC-  
61 I) (BA-D5, DSHB) or myosin heavy-chain-IIA (MHC-IIA) (N2.261, Enzo life Sciences) were  
62 conjugated to Alexa-Fluor 546 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) for fiber type  
63 determination. Images were captured with a high-resolution cooled digital DP-72 camera  
64 coupled to a BX-51 microscope (Olympus, Rungis, France) at a resolution of 0.64  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ .  
65 For each patient and condition, approximately three representative fields of 120 fibers were

66 selected. Using the image processing software Visilog-6.9 (Noesis, Gif-sur-Yvette, France),  
67 contractile type (I, I-IIA, IIA, IIA-IIX or IIX) and muscle fiber cross-sectional area were  
68 determined for each type. Only three fiber types were considered (type I, IIA and IIX muscle  
69 fibers). Type I-IIA and IIA-IIX fibers were integrated into type I and IIX fibers, respectively.

70

## 71 **Histoenzymology**

72 Cytochrome c oxidase (COx) activity was determined histochemically on serial transverse  
73 sections. Slides for COx assessment were incubated for 120 min at 37°C in 0.05 M phosphate  
74 buffer (pH 7.3) containing 20 mg of 3,3 -diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich),  
75 140 mg of cytochrome *c* (Sigma Biochemical, Poole, UK), 3 g of saccharose (Carlo Erba  
76 Reactive-SDS), and 4 ml of catalase (Sigma-Aldrich) solution. After incubation, slides were  
77 rinsed 3 times in distilled water and dehydrated in 3 different alcohol baths. Measurement of  
78 COx optical density was performed using Visilog-6.9 software. COx and MHC images were  
79 then matched to analyze the COx activity per fiber type (I, IIA, IIX). In accordance with the  
80 fiber cross-sectional area parameter, type I-IIA and IIA-IIX fibers were integrated into type I  
81 and IIX fibers, respectively.

82 The double labeling COx/SDH (succinate dehydrogenase) staining was realized in order to  
83 visualize the muscle fibers with mitochondrial dysfunction. Slides were first incubated in the  
84 COx medium for 120 min at 37°C and then rinsed in distilled water. Slides were after incubated  
85 in SDH medium for 120 min at 37°C in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 20 mg of  
86 nitroblue tetrazolium. After incubation, slides were rinsed 3 times in distilled water and  
87 dehydrated in 3 different alcohol baths. Fibers with normal COx activity demonstrate a brown  
88 reaction product whereas fibers with reduced or absent COx activity demonstrate the SDH blue  
89 reaction product (COx-/SDH+).

90

## 91 **Enzymes activities**

92 Approximately 20 mg of muscle were homogenized in 400  $\mu$ L of buffer (Manitol 225 mM, tris  
93 HCL 10 mM, saccharose 75 mM, EDTA 0.1 mM) with a tissue homogenizer (Ultra-Turrax T8  
94 IKA-Werke, Staufen, Germany). Samples were centrifuged (20 min, 650 g, 4°C) and the  
95 supernatant was carefully collected. The pellet was re-homogenized in 2/3 of previous buffer  
96 and centrifuged a second time (20 min, 650 g, 4°C). The supernatant was collected again and  
97 pooled with the supernatant. The protein concentration was determined with bovine serum  
98 albumin (BSA) as a standard (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) and the  
99 supernatants were stored at -80°C until subsequent analyses. Myokinase, creatine kinase,  
100 enolase, lactate dehydrogenase, citrate synthase,  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, second  
101 and fourth respiratory chain complexes maximal activities (UI/mg of protein) as determined by  
102 absorbance with a multi-label microplate reader (CLARIOstar, BMG LABTECH GmbH,  
103 Germany).

104

## 105 **Western blots**

106 Approximately 20 mg of muscles was homogenized with a Polytron homogenizer (PT 1200 E,  
107 Kinematica, Switzerland) in an ice-cold buffer containing 20 mM Tris, pH 7.0, 270 mM  
108 sucrose, 5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM  
109 sodium-glycerophosphate, 5 mM sodium pyrophosphate, 50 mM sodium fluoride, 1 mM DTT,  
110 and a protease inhibitor cocktail containing 1 mM EDTA (Roche Applied Science, Vilvoorde,  
111 Belgium). The samples were centrifuged for 10 min at 10,000 g at 4°C. Supernatants were  
112 collected and used for protein concentration assay with BSA as a standard (Pierce BCA Protein  
113 Assay Kit, Thermo Scientific) and subsequent western blot analysis. Ten  $\mu$ g of proteins were  
114 combined with Laemmli sample buffer and warmed for 5 min at 95°C (except for total oxphos  
115 warmed for 3 min at 55°C). Proteins were separated by SDS-PAGE (10-12% resolving gels)

116 during 2 hours at a constant intensity of 40 mA and transferred on polyvinylidene fluoride  
117 membranes at 80 V for 2.5 hours. After blocking for 1 hour in Tris-buffered saline plus 0.1%  
118 Tween 20 (TBST) containing 5% non-fat dry milk, membranes were incubated at 4°C overnight  
119 with one of the following antibodies: total oxphos complexes (ab110413, Abcam, 1:1000)  
120 against complex I (CI) subunit NDUFB8, CII subunit SDHB, complex III (CIII) subunit  
121 UQCRC2, CIV subunit MTCO1 and complex V (CV) subunit ATP5A, GLUT4 (MA5-17176,  
122 Thermo Fisher Scientific, 1:1000), CAII (carbonic anhydrase II, BIRBORB10230, VWR,  
123 1:250), CAIII (carbonic anhydrase III, BSBTPA1439, VWR, 1:1000), MCT1  
124 (monocarboxylate transporter 1, AB3538P, Merck Millipore, 1:1000) and MCT4  
125 (monocarboxylate transporter 4, AB3316P, Merck Millipore, 1:1000). Membranes were  
126 washed 3 times for 10 min in TBST, then incubated for 1 hour at room temperature with a  
127 secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase-conjugated antibody raised against  
128 rabbit (A6154; Sigma-Aldrich) or mouse (610-1319; Rockland Immunochemicals, Limerick,  
129 PA, USA). Three additional washes were performed before chemiluminescence detection with  
130 the ECL-Plus Western blot kit (Advansta, Menlo Park, CA, USA). Pictures were taken with a  
131 GBox (Syngene, Cambridge, United Kingdom) using the GeneSnap software. ImageJ software  
132 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) was used for quantifications. All protein  
133 expressions were reported to Coomassie blue density.

134

135

136  
137

**Table 2: Changes in muscle and energetic characteristics of untrained and trained SCD patients**

Variables	Untrained patients Relative change	Trained patients Relative change	p value
<b>Fiber type distribution, %</b>			
Type I Fibers	-14.2 [-30.4; +12.7]	-9.67 [-23.7; +19.4]	0.439
Type I-IIA Fibers	-18.2 [-43.2; +126]	+9.31 [-50.7; +218]	0.643
Type IIA Fibers	+2.15 [-13.1; +24.8]	-11.9 [-24.4; +11.3]	0.281
Type IIA-IIX Fibers	-21.5 [-26.9; +70.7]	-8.44 [-39.9; +5.91]	0.475
Type IIX Fibers	+17.9 [-2.81; +80.2]	+45.3 [+9.79; +96.9]	0.565
<b>Muscle cross-sectional area, <math>\mu\text{m}^2</math></b>			
Type I Fibers	-7.16 (5.05)	+7.41 (4.25)	<b>0.038</b>
Type IIA Fibers	-0.11 (6.50)	+8.14 (3.18)	0.283
Type IIX Fibers	+0.94 [-8.55; +28.5]	+8.31 [-0.19; +17.4]	0.691
All	-3.99 (5.61)	+4.90 (2.59)	0.178
<b>Fibers Cox activity, A.U</b>			
Type I Fibers	+4.22 (1.99)	+11.4 (2.98)	<b>0.042</b>
Type IIA Fibers	+3.57 (2.51)	+7.5 (2.97)	0.317
Type IIX Fibers	-0.17 [-4.71; +2.48]	+4.75 [-4.04; +8.29]	0.552
All	+3.06 (1.98)	+7.13 (2.76)	0.232
<b>Enzyme activity, UI/mg</b>			
MK	+7.14 (7.65)	+6.52 (10.8)	0.962
CK	-4.40 [-6.60; +0.11]	-1.76 [-4.82; +3.64]	0.451
ENO	+2.65 (6.19)	-3.15 (4.88)	0.482
LDH	+5.31 (3.21)	+5.02 (3.11)	0.950
CS	-9.21 (5.53)	+27.7 (3.59)	<b>&lt; 0.001</b>
$\beta$ -HAD	-3.96 (5.59)	+19.5 (6.24)	<b>0.009</b>
CII	+0.73 [-9.90; +7.24]	-1.36 [-11.3; +9.31]	1.000
CIV	-7.98 (7.50)	+31.4 (14.4)	<b>0.017</b>
CIV/CII	-5.67 (8.82)	+37.8 (17.0)	<b>0.026</b>
<b>Protein expression, A.U</b>			
NDUFB8	-0.77 (7.52)	+18.0 (5.20)	<b>0.049</b>
SDHB	+5.12 [-26.1; +16.3]	+12.0 [+9.05; +17.1]	0.101
UQCRC2	-5.50 (8.76)	+23.5 (3.59)	<b>0.005</b>
MTCO1	-16.0 [-33.5; +0.49]	+25.1 [+9.93; +38.6]	<b>0.003</b>
ATP5A	-8.70 (3.93)	+7.38 (2.76)	<b>0.002</b>
MTCO1/SDHB	-1.92 (5.76)	+11.5 (6.46)	0.133
GLUT4	+12.5 [-16.7; +58.4]	+27.9 [-19.6; +45.3]	0.981
CAII	+8.27 (7.41)	-5.91 (6.04)	0.153
CAIII	-3.71 [-25.7; +30.4]	+0.55 [-19.9; +19.0]	0.818
MCT1	+19.6 [-11.4; +49.5]	+7.91 [-17.9; +39.5]	0.571
MCT4	-6.08 [-19.2; +7.98]	+1.44 [-15.3; +12.3]	0.613

138 Results are expressed as mean (SEM) or median [IQR]. **Bold** results are statistically significant  
 139 at the P<0.05. SEM, standard error of the mean; COx, cytochrome c oxidase; MK, myokinase;  
 140 CK, creatine kinase; ENO, enolase; LDH, lactate dehydrogenase; CS, citrate synthase;  $\beta$ -HAD,  
 141  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; NDUFB8, SDHB, UQCRC2, MTCO1 and ATP5A,  
 142 subunits of complex I, II, III, IV and V of the respiratory chain respectively; GLUT4, glucose  
 143 transporter type 4; CAII, anhydrase carbonic II, CAIII, anhydrase carbonic III, MCT1,  
 144 monocarboxylate transporter 1; MCT4, monocarboxylate transporter 4

# ÉTUDE 3

## REPONSES DU POTENTIEL REGENERATIF MUSCULAIRE DU PATIENT DREPANOCYTAIRE SUITE A L'ENTRAINEMENT EN ENDURANCE

*L'étude précédente a mis en évidence une légère hypertrophie des fibres musculaires des patients entraînés en réponse à l'entraînement en endurance. Dans ce contexte, les objectifs de cette étude étaient d'analyser la réponse du potentiel régénératif musculaire puis d'étudier son rôle dans l'adaptation structurale observée.*

*Pour cette étude, les analyses ainsi que l'écriture de l'article ont été réalisés par Léa Januel dans le cadre de son master 2 ingénierie de la santé. J'encadrais ce travail. Les expérimentations de cette étude ont été réalisées au sein du Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (LIBM) et du laboratoire Biologie, Ingénierie et Imagerie de la Cornée (BiGC), de l'Université Jean Monnet à Saint-Etienne.*

---

### **ARTICLE ASSOCIÉ :**

Januel L, **Merlet AN**, He Z, Gellen B, Bartolucci P, Messonnier LA, Féasson L.

Could moderate-intensity endurance-exercise training modulate muscle regeneration potential of sickle cell disease patients?

*En cours d'écriture. Article formaté pour Journal of Histochemistry & Cytochemistry.*

---

## **Contexte et objectifs**

Les études 1 et 2 mettent en évidence des bénéfices au niveau du réseau microvasculaire et des capacités énergétiques du muscle des patients drépanocytaires en réponse à un entraînement en endurance, mais également un gain de surface transversale de leurs myocytes. Ce dernier point est intéressant car malgré l'intensité modérée de l'exercice, il semble que cet entraînement provoque une légère hypertrophie des fibres musculaires et particulièrement des fibres musculaires de type I par rapport au groupe contrôle (Gellen et al. 2018 ; Merlet et al. étude 2). Aussi, la relative re-densification du réseau microvasculaire observée après l'entraînement (Merlet et al. étude 1) est également un argument en faveur d'un lien avec les cellules satellites (Christov et al. 2007 ; Nederveen et al. 2018 ; Mounier et al. 2011). Dans ce contexte, les objectifs de cette étude étaient d'identifier et de comparer le contenu en cellules satellites des patients drépanocytaires et d'observer la possible mise en jeu de ces acteurs du potentiel régénératif musculaire en réponse à l'entraînement. Nous pouvons donc émettre les hypothèses que ce type d'entraînement modéré i) ne devrait pas engendrer de dégradation tissulaire et ainsi ne pas engager de réel processus régénératif, mais ii) pourrait néanmoins activer les cellules satellites de sorte qu'elles aient contribué au discret gain de taille observé sur les fibres musculaires entraînées et sur l'augmentation du réseau microvasculaire.

## **Méthodes**

Pour répondre à ces hypothèses, des techniques immunohistochimiques en fluorescence ont été réalisées afin de mettre en évidence sur des coupes sériées i) la typologie et la surface de section des fibres musculaires, ii) les cellules satellites et les fibres musculaires en régénération, et iii) les cellules satellites activées. La membrane des cellules satellites a été marquée avec l'anticorps CD56 qui a l'avantage de marquer également le cytosol des fibres musculaires en régénération. L'anticorps Ki67 a été utilisé pour marquer les noyaux cellulaires activés et ainsi parmi les cellules satellites, celles en prolifération. Pour chaque paramètre mesuré, la typologie de la fibre musculaire a été prise en compte (voir partie matériels et méthodes).

## **Résultats et discussion**

Tout d'abord, aucune fibre nécrotique n'a été observée dans les 2 groupes avant et après le protocole. Ce résultat suggère que le protocole d'entraînement n'a pas engendré de dégradation tissulaire notable ce qui est un argument supplémentaire de l'innocuité de ce type d'entraînement pour le tissu musculaire.

De plus, les résultats de cette étude rapportent une forte tendance à l'augmentation (ou plutôt maintien) de la surface transversale des fibres musculaires de type I des patients

---



entraînés par rapport aux patients contrôles ( $P=0,051$ ). Également, le nombre de myonucléi par fibres avait tendance à augmenter dans le groupe entraîné, par rapport à celui du groupe contrôle ( $P=0,072$ ). Cette tendance était d'autant plus marquée pour les fibres de types I ( $P=0,068$ ). Par conséquent, nous pouvons supposer que cette incorporation de myonucléi spécifiques aux fibres musculaires de types I en réponse à l'entraînement, soutient l'augmentation relative de la surface des fibres musculaires du même type.

Enfin, après 8 semaines d'entraînement, les indices de régénération (le contenu en cellules satellites, le nombre de noyaux internalisés, le nombre de fibres en régénération, le nombre de cellules satellites actives) sont restés inchangés.

### **Conclusion**

En résumé, cette étude a mis en évidence les effets d'un entraînement en endurance d'intensité modérée sur le potentiel de régénération musculaire des patients drépanocytaires. Les résultats démontrent que cet entraînement est sans danger pour le tissu musculaire et qu'il entraînerait une légère hypertrophie des fibres musculaires de type I. D'autres analyses sont cependant nécessaires pour déterminer la participation potentielle des cellules satellites.

---

1 **Could moderate-intensity endurance-exercise training modulate muscle**  
2 **regeneration potential of sickle cell disease patients?**

3  
4 Léa Januel, Angèle N. Merlet, Zhiguo He, Christophe Hourde, Pablo Bartolucci, Barnabas  
5 Gellen, Laurent A. Messonnier, Léonard Féasson

6  
7 From Univ. Lyon, UJM-Saint-Etienne, Inter-university Laboratory of Human Movement  
8 Sciences, EA7424, F-42023 Saint-Etienne, France (LJ, ANM, LF); Univ. Lyon, UJM-Saint-  
9 Etienne, Biology, Engineering and Imaging of Corneal Grafts Laboratory, EA 2521, F-42023  
10 Saint-Etienne, France (ZH); Univ. Savoie Mont Blanc, Inter-university Laboratory of Human  
11 Movement Sciences EA7424, F-73000 Chambéry, France (CH, LAM); Department of Internal  
12 Medicine, Henri Mondor University Hospital-UPEC, AP-HP, Créteil, France (PB); Department  
13 of Public Health, Henri Mondor University Hospital-UPEC, AP-HP, Créteil, France (PB);  
14 Department of Cardiac Rehabilitation, Henri-Mondor University Hospital, AP-HP, Creteil,  
15 France (BG); ELSAN, Polyclinique de Poitiers, France (BG); Myology Unit, Referent Center  
16 of Rare Neuromuscular Diseases, Euro-NmD, University Hospital of Saint-Etienne, France  
17 (LF).

18  
19 **Corresponding author:**

20 Léonard Féasson,  
21 Unité de Myologie, Bâtiment IRMIS, Campus Santé Innovations, Hôpital Nord  
22 42 055 CHU de St Etienne, Cedex 2,  
23 France  
24 leonard.feasson@univ-st-etienne.fr

25  
26 **Key words**

27 satellite cells, exercise, sickle cell anemia, CD56, Ki67  
28

29 **Summary**

30 Sickle cell disease (SCD) is a genetic hemoglobinopathy which major consequences are: severe  
31 chronic hemolytic anemia and vaso-occlusive crises. SCD also induces muscle tissue  
32 remodeling that includes amyotrophy and a high satellite cell (SC) pool. Traditionally  
33 unadvised, physical activity, when adapted, has proven its safety and functional benefits for  
34 SCD patients. Our study aims at investigating the effect of an endurance training program on  
35 the muscle regenerative potential of SCD patients. SCD patients were randomized into: group  
36 Trained (N=20) that followed an 8-week adapted endurance training program and group  
37 Untrained (N=20) that maintained its usual lifestyle. Biopsies of the *vastus lateralis* were  
38 performed before and after the training period. Serial muscle cross-sections were subjected to  
39 histochemical analyses. No clear expansion or activation of the SC pool were observed after  
40 training. A relative maintenance of type I fiber area ( $p=0.051$ ) and a relative increase of the  
41 number of myonuclei per fiber ( $p=0.072$ ) were observed in SCD trained patients. No major  
42 change of the remodeling indices was observed. Physical activity, adapted to the SCD  
43 physiopathology, is safe for the muscle tissue. It even participates to a specific type I fibers  
44 hypertrophy but further analyses are required to confirm the potential SCs involvement.

45

46

## 47 **Introduction**

48 Sickle cell disease (SCD) is the most common monogenic disorder worldwide, and the number  
49 of patients is continually increasing.<sup>1</sup> This hemoglobinopathy, related to the synthesis of  
50 abnormal hemoglobin (HbS), constitutes thus a major and global health problem. When  
51 deoxygenated, HbS may polymerize and therefore trigger the sickling of the erythrocytes<sup>1</sup>  
52 which results in their i) higher fragility, ii) higher adherence to endothelium and iii) lower  
53 deformability. SCD patients are therefore subjected to severe chronic hemolytic anemia  
54 induced by the breakage of the erythrocytes and to vaso-occlusive crisis (VOC) caused by the  
55 entrapment of the erythrocytes in the microvasculature.<sup>1</sup>

56 Despite huge gains in terms of life expectancy accumulated during the last few decades,  
57 SCD patients remain confronted to a highly deteriorated quality of life.<sup>1</sup> In the context of  
58 chronic diseases inducing a poor quality of life, physical activity is now a well-recognized  
59 adjuvant treatment that helps fighting against muscle wasting and physical deconditioning.<sup>2,3</sup>  
60 Recently, Ravelojaona et al.<sup>4</sup> underlined a profound remodeling of the skeletal muscle in SCD  
61 patients including a clear amyotrophy, a capillary network rarefaction, a satellite cell (SC) pool  
62 expansion and muscle energetic adaptations. The muscle tissue characteristics of SCD patients  
63 are comparable to deconditioned persons. These modifications may explain the functional  
64 repercussions of SCD that include strength reduction<sup>5,6</sup> and exercise intolerance.<sup>7</sup> Tissular  
65 lesions caused by VOC may partly explain the muscle tissue remodeling, but the lower activity  
66 level of SCD patients<sup>8</sup> could also play a role. Because acidosis, rapid changes of the body  
67 temperature and hypoxia trigger sickling, physical activity has long been forbidden to SCD  
68 patients.<sup>9,10</sup> Nevertheless, recently a study showed the interest of aerobic exercise for the quality  
69 of life of SCD patients,<sup>11</sup> and another one demonstrated the safety and feasibility of endurance  
70 training for SCD children.<sup>12</sup> Our protocol, that was the first to evaluate a moderate-intensity  
71 adapted and supervised training program in adult SCD patients, demonstrated the safety of this  
72 program and the benefits in terms of quality of life (Gellen et al., *in progress*). The muscle  
73 tissue analysis showed a relative hypertrophy of type I muscle fibers that could possibly be  
74 explained by the SC involvement (Merlet et al. energetic). At quiescent state, SC are localized  
75 under the myocytes basal lamina. When activated, upon stimulation such as damage or exercise,  
76 SCs proliferate and then either differentiate into myoblasts or return to quiescence to replenish  
77 the SC pool.<sup>13,14</sup> The newly formed myoblasts fuse to each other or to existing myocytes and  
78 consequently support the muscle regeneration or the muscle growth. Some studies on both  
79 healthy or ageing subjects showed signs of a SC expansion and/or activation in response to  
80 aerobic exercises.<sup>15-19</sup> Investigating the SC response to endurance training among the sedentary

81 and amyotrophic but also well-SC-fitted SCD population, could be informative regarding the  
82 safety of the program for the muscle tissue and the possible SCs hypertrophic role in response  
83 to this specific training.

84 The present study aimed at evaluating the effects of an 8-week individually-tailored  
85 moderate-intensity endurance training program on the skeletal muscle regeneration potential in  
86 SCD patients. We hypothesized that this training, would i) not be harmful for the muscle tissue,  
87 ii) mobilize the muscle regeneration potential and thus iii) support a moderate muscle  
88 hypertrophy. We expected a fiber-type specific effect of the training, mostly directed to type I  
89 fibers.

90

## 91 **Materials and Methods**

### 92 *Subjects*

93 33 of 40 adults homozygous SCD patients included have completed this study [34 (19; 53)  
94 years old, 18 men (55%) and 15 women (45%)]. Patients' baseline characteristics were reported  
95 separately and were similar between groups (Gellen et al. *under review*). This study took place  
96 at APHP - Hôpitaux Universitaires Henri Mondor in the reference center for major sickle cell  
97 syndromes, the cardiac rehabilitation unit and the functional and respiratory explorations unit  
98 at Créteil (France). Eligible volunteers were informed about the nature and risks of the  
99 experimental procedures before written consent was obtained. This study was approved by the  
100 ethics committee and conformed to the standards set by the Declaration of Helsinki for human  
101 studies. The University Hospital of Saint-Etienne was the promoter of this study  
102 (ClinicalTrials.gov NCT02571088). All patients underwent preliminary screening, including a  
103 medical examination and a blood phenotype analysis. Patients were excluded if they had  
104 suffered of a vaso-occlusive episode in the six weeks preceding the protocol; transfused for less  
105 than three months; had AIDS; had illness particularly unresolved inflammatory illness for less  
106 than a month; had any other hemoglobinopathy than SCD; had cardiac arrhythmia; had  
107 pacemaker; had cardiac antiarrhythmic therapy - medical treatment modifying the activity of  
108 the ANS: beta-blockers, sympathomimetic, atropine; had type I or II diabetes; had morbid  
109 obesity (BMI above 35); or were pregnancy, postpartum, breastfeeding.

110

### 111 *Study Design*

112 SCD patients were subjected a submaximal incremental exercise test, and at least 5 days later,  
113 a muscle biopsy was taken. Then, patients were randomly assigned either to a trained (N=20)  
114 or an untrained (N=20) group. Subsequently, the patients of the trained group realized a specific

115 endurance training program while the patients of the untrained group maintained their usual  
116 lifestyle. The exercise test was repeated and a second biopsy sample was taken in the same  
117 conditions eight weeks later, which corresponds to the end of the training period for the trained  
118 group.

119  
120 *Submaximal Incremental Tests.* The tests were performed on a cycle-ergometer (Ergoselect  
121 Confort, General Electric, USA). Exercise started at a workload of 20 or 30 W, and increased  
122 every 2 min by 10 or 15 W for females or males, respectively. ECG and gas exchanges  
123 (ErgoCard, Medisoft, Sorinnes, Belgium) were continuously recorded while blood lactate  
124 concentration (Lactate Scout+, EKF diagnostics, Cardiff, UK) was assessed every min and  
125 blood pressure as well as perceived rate of exertion were recorded once at mid stage. Exercise  
126 was stopped as soon as a blood lactate concentration  $\geq 4$  mmol/liter was recorded. Exercise was  
127 followed by 2 min of active recovery and 8 minutes of passive recovery. Workloads at the first  
128 lactate threshold (WLT1) and at 2.5 mmol/liter of blood lactate concentration were determined.

129  
130 *Muscle Biopsies.* Muscle biopsies were obtained from the *vastus lateralis* according to the  
131 percutaneous technique.<sup>20</sup> The second biopsy was collected a few centimeters away from the  
132 first one in order to avoid potential muscle lesions of the former biopsy. After shaving, asepsis  
133 and a local anesthesia, a small incision was made until the crossing of the epimysium, through  
134 which the Weil-Blakesley forceps (Lawton, Tittlingen, Germany) was introduced in the  
135 subjacent muscle, and the sample extracted (approximately 150 mg). Parts of the biopsy sample  
136 containing well identified fascicles were oriented under a stereo microscope, frozen in  
137 isopentane (Chevron Phillips Chemicals International, Overijse, Belgium) and finally stored in  
138 liquid nitrogen until immunohistochemical analyses were performed.

139  
140 *Endurance Training Program.* Patients of the trained group realized a 24-session endurance  
141 training program (8 weeks, 3 sessions a week). Each session was performed on a cycle  
142 ergometer and consisted of: i) an initial warm-up; ii) a constant-load endurance exercise (30  
143 min leading to steady state in blood lactate concentrations at approximately 2.5 mmol/L); iii) a  
144 cool-down (5 min); and finally iv) a light stretching period (5 min). All sessions were performed  
145 under the supervision of a physician to ensure the clinical observation of the patients and  
146 particular attention was paid to their hydration. During the training sessions, specific arterial  
147 oxygen saturation, heart rate and blood lactate concentrations were regularly measured to  
148 ensure the safety of the exercise and the absence of lactate concentrations drift. Based on the

149 blood lactate concentrations recorded during each training session, and assuming a target  
150 approximately set at 2.5 mmol/L, exercise workload could be readjusted for the following  
151 sessions.

152

### 153 *Histochemical and Immunohistochemical Analyses*

154 From all muscle biopsies, 10- $\mu$ m-thick cross-sections were cut at -20°C using a cryostat, and  
155 stored at -80°C for subsequent analyses. Four serial muscle cross-sections were stained for:  
156 muscle fiber-type distribution, satellite cell content, proliferating satellite cell content, necrotic  
157 and segmented fibers. Slides coming from both groups and both sessions (initial or final biopsy)  
158 were stained in the same batch. All measurements were performed following a blind procedure  
159 concerning the groups.

160

161 *Fiber Type Distribution.* The first serial muscle cross-sections were stained with antibodies  
162 directed against type I myosin heavy chain and laminin for muscle fiber-type distribution.  
163 Staining procedure was as follows. Slides were air-dried for one hour. Thereafter, muscle cross-  
164 sections were incubated with a 10% bovine serum albumin (BSA) diluted in a phosphate-  
165 buffered saline (PBS) for 15 minutes at room temperature. Next, slides were incubated for one  
166 hour at +37°C with primary antibodies: anti-laminin- $\alpha$ 1 (1:200, rabbit, Sigma, Saint-Quentin-  
167 Fallavier, France) and BA-D5 (2:3, mouse, Developmental Studies Hybridoma Bank). Slides  
168 were washed in PBS (one short wash followed by a 10-min one), and then incubated for one  
169 hour in the dark at +37°C with the appropriate secondary antibodies: Alexa Fluor 546 (1:400,  
170 goat anti-mouse, Invitrogen, Cergy- Pontoise, France), and Alexa Fluor 488 (1:400, goat anti-  
171 rabbit, Invitrogen, Cergy- Pontoise, France), diluted in 10% BSA and PBS. Again slides were  
172 washed and mounted with Fluoromount (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The sections  
173 were allowed to dry overnight at +4°C in the dark and stored in the same conditions until further  
174 analysis.

175

176 *Satellite Cell Content.* The second serial slides were stained for satellite cell content with  
177 primary antibodies directed against laminin and CD56. CD56 has been frequently used for the  
178 identification of SCs and regenerating fibers.<sup>21</sup> In addition, nuclei were stained with 4'6-dia-  
179 midino-2-phenylindole (DAPI). Staining procedure was entirely realized at room temperature  
180 as follows. Muscle cross-sections were air-dried for 30 min, then fixed (10 min in 4%  
181 formaldehyde). After two short washes in PBS, slides were incubated for one hour with a buffer  
182 agent (10% human serum, 90% PBS). Slides were then washed in PBS (one short wash



183 followed by a 10-min one). Thereafter, slides were incubated for two hours with the primary  
184 antibodies: CD56 (1:50, mouse, Dako, Santa Clara, California) and anti-laminin- $\alpha$ 1 (1:200,  
185 rabbit, Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France), diluted in a 10% human serum and a PBS  
186 solution. Again, slides were washed in PBS, and then incubated for one hour in the dark with  
187 the appropriate secondary antibodies: Alexa Fluor 568 (1:400, goat anti-rabbit, Invitrogen,  
188 Cergy- Pontoise, France), and Alexa Fluor 488 (1:400, goat anti-mouse, Invitrogen, Cergy-  
189 Pontoise, France), diluted in 10% human serum and PBS. After a final wash in PBS, the slides  
190 were mounted with DAPI (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The sections were allowed to  
191 dry overnight at +4°C in the dark and then stored in the same conditions until further analysis.

192

193 *Proliferating Satellite Cell Content.* The third serial slides were stained for proliferating satellite  
194 cell content with primary antibodies directed against CD56, Ki67 and DAPI. Ki67 is a  
195 proliferating marker which, combined with DAPI and CD56, allows the identification of active  
196 proliferating satellite cells.<sup>22</sup> Staining procedure was the same as described for slide 2 expect  
197 that 0.2% Triton was added to the buffer agent and to the antibodies solutions, and Ki67 (1:500,  
198 rabbit, Abcam, Cambridge, United-Kingdom) was used instead of Laminin. Secondary  
199 antibodies were Alexa Fluor 546 (1:400, goat anti-mouse, Invitrogen, Cergy- Pontoise, France),  
200 and Alexa Fluor 488 (1:400, goat anti-rabbit, Invitrogen, Cergy- Pontoise, France).

201

202 *Necrotic and segmented fibers.* An hematoxylin-eosin-saffron (HES) staining was performed  
203 on the fourth serial slides to enable the evaluation of muscle remodeling signs: either  
204 degenerative with necrotic fibers or regenerative with segmented fibers. Muscle cross-sections  
205 were air-dried for one hour. Next slides were dipped in hemalum for 5 min and then washed  
206 several times with distilled water. After, slides were dipped in eosin for 2 min and then washed  
207 twice in absolute alcohol baths. Thereafter, slides were dipped in saffron for 5 min and then  
208 washed in three successive alcohol baths: 95% alcohol, 100% alcohol and 100% alcohol  
209 respectively. Finally, slides were dipped in xylene for a few seconds and then mounted with  
210 Eukitt (Eukitt®, EUK 100, CML, Nemours, France) The sections were allowed to dry one hour  
211 under a hood and then stored in the dark at room temperature.

212

### 213 *Data Analyses*

214 From the biopsy slides, all images were captured using an inverted epifluorescence microscope  
215 (IX-81, Olympus Corp., Tokyo, Japan) - objective was 10 and magnification was 100 - coupled  
216 with a microscope digital camera (DP74, Olympus, Japan) with a X0.63 adaptor and the

217 software CellSens Dimension (Olympus, Germany). Images from the fiber-type slides were  
218 captured at a resolution of 1,920x1,200 while images from slides used for SC content and  
219 proliferating SC content were captured at a high resolution of 5,760x3,600 pixels. Image  
220 processing and analysis were done using ImageJ software (U. S. National Institutes of Health,  
221 Bethesda, Maryland, USA). The mean number of analyzed fibers per sample was 284 (min:  
222 121; max: 515), except for the myonuclear content and myonuclear domain analyses [mean: 65  
223 (min: 39; max: 121)].

224 Slide 1 was used to determine the fiber type: BA-D5<sup>+</sup> fibers were considered as type I  
225 fibers whereas BA-D5<sup>-</sup> fibers were considered as type II fibers. The fiber type was taken into  
226 account for all analyses. Based on slide 2, laminin was used to determine cell borders, and the  
227 fiber area. SCs were determined at the periphery of each fiber and stained positive for both  
228 CD56 and DAPI. Laminin was used to assess whether SCs were inside the fiber basal lamina  
229 or not, and SCs that were not located under the basal lamina were considered as active migrating  
230 SCs. Internalized nuclei and regenerating fibers (CD56<sup>+</sup> fiber) were also determined from slide  
231 2. In addition, within each image, the number of myonuclei per fiber and the mean fiber area  
232 per myonuclei – also referred to as myonuclear domain area [fiber cross-sectional area  
233 (CSA)/number of myonuclei] were determined. Finally, on slide 3, proliferating SCs were  
234 determined with the co-staining of the Ki67, CD56 and DAPI. The visible light allowed the  
235 identification of the fibers and the matching with the other two serial cross-sections. The  
236 number of proliferating SCs was expressed for 100 SCs, in accordance with others studies.<sup>22,23</sup>  
237 Based on slide 4, necrotic and segmented fibers were analyzed on the entire cross-section and  
238 expressed in number of subjects showing histological signs.

239

#### 240 *Statistics*

241 The normality of each variable was assessed with the Shapiro-Wilk test. Descriptive results are  
242 expressed as mean (standard error of measurement, SEM) when they follow a normal  
243 distribution, or median [inter-quartile range, IQR] when they don't. The statistical analyses  
244 compared the absolute mean change (before *versus* after) between groups (trained and  
245 untrained). T-tests for independent groups were used for variables following a normal  
246 distribution, while in the absence of a normal distribution, Mann-Whitney tests were used for  
247 variables independent by group. Statistical significance was set at P<0.05, while a trend was  
248 considered for 0.1<P<0.05. All calculations were performed using Statistica 8 (StatSoft Inc.,  
249 Tulsa, Oklahoma, USA).

250

251 **Results**

252 No significant between-group differences were found for changes from baseline of muscle  
253 characteristics (Table 1). Changes in muscle characteristics after 8 weeks of endurance training  
254 in SCD patients are presented in Table 2.

255

256 *Fiber Size and Myonuclei*

257 Over the period, type I fibers CSA was slightly increased for the trained patients while it  
258 decreased for the untrained ( $p=0.051$ ) (Fig. 1B). No difference between groups was observed  
259 as regards of the absolute change of type II fibers CSA. A statistical trend was observed for the  
260 absolute change of myonuclei per fiber ( $p=0.072$ ) with a relative increase in the trained patients  
261 as compared with the untrained. The fiber specific analysis of the myonuclear content showed  
262 no change over time in the type II fibers and a statistical trend in the type I fibers with a relative  
263 increase of myonuclei per fiber among the trained subjects ( $p=0.068$ ) (Fig. 1C). In the  
264 meantime, there was no significant change between groups in terms of myonuclear domain  
265 area.

266

267 *Satellite Cells*

268 After 8 weeks of endurance training, no significant change in the SC content per fiber was  
269 observed. Quantification of SCs expressing Ki67 showed that only few patients had  
270 proliferating SCs: prior to intervention, only 8 (24%) in the 33 subjects showed signs of  
271 proliferating SCs, and 11 (33%) after treatment. No significant difference between groups was  
272 detected in the absolute change of the number of proliferating SC per SC, or the number of  
273 migrating SC per SC over time.

274

275 *Indices of Remodeling*

276 At baseline, regenerative fibers and internalized myonuclei were observed in most patients: 22  
277 (67%) in the 33 patients showed CD56<sup>+</sup> fibers and 21 (64%) showed internalized myonuclei.  
278 Quantification of fibers expressing CD56 and internalized nuclei showed no significant change  
279 over time between groups. No sign necrotic fiber was detected in any patient, either before or  
280 after the period.

281

282 **Discussion**

283 Despite considerable gains in life expectancy, SCD patients remain confronted to a poor quality  
284 of life. The lack of physical exercise, that has long been forbidden to them due to the Hb sickling  
285 it can provoke, might participate to their muscle atrophy, and consequently to their reduced  
286 quality of life.<sup>8</sup> This study was the first clinical randomized controlled trial evaluating the  
287 impact of an 8-week individualized moderate-intensity endurance training on the muscle  
288 regenerative potential of SCD patients. We hypothesized that this training program would be  
289 safe for the muscle tissue and would slightly activate the muscle regenerative potential to  
290 participate to the type I fibers hypertrophy previously observed by our team (Merlet et al.  
291 energetic). Our main finding was that no sign of muscle lesion was observed after training,  
292 showing the program was safe for the muscle tissue.

293         Following a lesion, the muscle tissue can be restored with the help of the SCs. After  
294 injury, the SCs can become active and will first extensively migrate to the site of the lesion and  
295 then successively proliferate, differentiate and fuse to regenerate the fiber.<sup>13</sup> In the present  
296 study, no change neither of the SCs pool content, nor of the number of active (migrating or  
297 proliferating) SCs or the regenerating fibers after training was observed as compared with  
298 untrained subjects. Furthermore, no sign of necrotic fibers was observed in any muscle cross  
299 section. Moreover, no deterioration of the fiber CSA was observed after training. Taken  
300 together, these data suggest that the training program did not result in muscle tissue lesion and  
301 thus the program that was safe for the muscle tissue. Furthermore, the trophic adaptations,  
302 including increases in the fiber CSA, and myonuclei per fiber were directed to aerobic type I  
303 fibers only. These results are therefore consistent and reinforce previous assessment showing  
304 that the training program only slightly solicited the glycolytic metabolism (Merlet et al., *in*  
305 *progress*). Considering that the glycolytic metabolism is responsible for the exercise-induced  
306 acidosis, the low utilization of this metabolism backs the assertion that an adapted endurance  
307 training program is safe for SCD patients (Merlet et al., *in progress*).

308         Not only can SCs be activated by a muscle lesion but also by physical exercise, in such  
309 case the SCs activation can lead to muscle hypertrophy.<sup>24</sup> If resistance training is a well-  
310 recognized trigger of the SCs activation, it has also been demonstrated more recently that  
311 endurance training can also have such effect.<sup>15</sup> Consistently with previous assessments,<sup>4</sup> at  
312 baseline, the fibers CSA is low which is consistent with previous studies,<sup>4</sup> and shows a clear  
313 muscle hypotrophy. The endurance training resulted in a thin relative increase of type I fibers  
314 CSA for the trained patients as compared with a slight decreased for the untrained, which  
315 corroborates previous measurements realized within the same protocol but on different area of  
316 the muscle biopsies (Merlet et al. energetic). The fiber-type specific response to exercise can

317 be explained by the type I fiber preferential recruitment during low-intensity endurance  
318 exercises. Muscle type I fiber slight hypertrophy can be supported either by a myonuclear  
319 domain area increase or by nuclear accretion.<sup>25</sup> Presently, the baseline myonuclear domain  
320 measurement differed between groups, which hampered the comparison of the evolution over  
321 time. However, among the trained patients, while the fibers CSA increased, the myonuclear  
322 domain seemed to decrease (-167 (461)  $\mu\text{m}^2$ ). In the meantime, the number of myonuclei per  
323 fiber tended to raise for the trained patients in comparison with the untrained ones ( $p=0.072$ ).  
324 This trend was mostly supported by a tendency to an increase of the type I fibers myonuclear  
325 content ( $p=0.068$ ). Therefore, we suggest that this fiber-type-specific nuclei incorporation  
326 supported the above-mentioned endurance training-related type I fiber surface area relative  
327 increase. In this case, considering that newly incorporated nuclei are former satellite cells,  
328 endurance training would have led to a mobilization of the SC pool that would have supported  
329 the type I fibers nuclei incorporation and subsequently the type I fiber CSA maintenance. At  
330 baseline, the SC pool is consistent with previous measurements in a SCD population.<sup>4</sup>  
331 Nevertheless, no significant change of the SC pool content was observed over the 8 weeks of  
332 intervention in the type I fibers among the trained subjects as compared with the untrained.  
333 Interestingly, SC activation but no SC pool expansion was observed by Joannis et al.<sup>25</sup> after  
334 continuous endurance training. The authors concluded in a SCs contribution to the endurance-  
335 training muscle adaptations where proliferation and differentiation are matched and therefore  
336 suggested to analyze more indicators than the SC pool expansion only. To our knowledge, our  
337 study was the first to assess the number of active SCs among a SCD population and we  
338 distinguished two steps of activation: migration and proliferation. At baseline, the mean level  
339 of proliferating satellite cells was very low which is consistent with the amounts observed in  
340 the general population at rest.<sup>22</sup> Moreover, most patients had signs of migrating SCs. The  
341 training didn't induce any change in terms of active SC contents either migrating or  
342 proliferating. Conversely, various studies observed higher SCs activation after endurance-type  
343 exercises: 48h after a single bout of endurance of training in sedentary old men,<sup>26</sup> and after a  
344 moderate-intensity continuous exercise training in recreationally active adults.<sup>25</sup> These  
345 discrepancies can be explained since in our study i) the endurance training intensity was lower,  
346 ii) the training period was longer, iii) the delay between the final training session and the latter  
347 biopsy was longer (a week), and also iv) the markers used for the SC activation differed. The  
348 realization of iterative biopsies during the training program, and the multiplication of SC  
349 activation markers (e.g. Ki67 and MyoD) might have provided further information on the  
350 muscle regenerative potential of SCD patients and the SCs contribution to the type I

351 hypertrophic trend. Of note, Ravelojaona et al.<sup>4</sup> did not exclude a default in the regenerative  
352 process among SCD patients since they had less internalized nuclei and regenerating fibers than  
353 sickle cell trait carriers. Our result is consistent with most patients showing signs of  
354 regeneration. The characterization of active satellite cells, and their presence in most patients  
355 (either proliferating or migrating) gives additional information concerning the regeneration  
356 potential and comforts the idea that SCD patients do not have alteration of their muscle  
357 regeneration potential. However, the reduced muscle capillarization among the SCD  
358 population<sup>4</sup> could dampen the regeneration process since micro-vascularization is an important  
359 factor of this process.<sup>28</sup> Recent findings showed that moderate-intensity endurance training  
360 enhanced capillary density and numbers of capillaries in contact with muscle fibers in a SCD  
361 population (Merlet et al., *in progress*). It could be interesting to realize further analyses to  
362 investigate the evolution of the relationships between capillarization and SCs over the training  
363 period.

364

### 365 **Conclusion**

366 In summary, the present study highlighted for the first time the effects of an 8-week moderate-  
367 intensity endurance training on the muscle regenerative potential in patients with SCD. An  
368 adapted endurance training program is safe for the muscle tissue of SCD patients. This training  
369 program also participates to a type I fibers slight hypertrophy and further analyses are required  
370 to determine the SCs potential involvement.

371

### 372 **Acknowledgments**

373 We thank John Temesi for editorial assistance. We thank Marie-Pierre Blanc, Dominique  
374 Gouttefangeas and Marion Ravelojaona (Myology Unit, Referent Center of Rare  
375 Neuromuscular Diseases, Euro-NmD, University Hospital of Saint-Etienne, France) for hepful  
376 technical assistance.

377

### 378 **Competing Interest**

379 The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship,  
380 and/or publication of this article.

381

### 382 **Author Contributions**

383 LAM, LF, BG and PB designed and conducted this study. ANM, LJ and LF design the  
384 histochemical and immunohistochemical analyses and ANM and LJ carried them out. CH, ZH

385 contributed to the technical assistance. LJ did the analysis and wrote the first draft of the article.

386 All authors critically reviewed the draft and approved the final version for publication.

387



388 **Literature Cited**

- 389 1. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sick cell Disease. *N Engl J Med.*  
390 2017;376(16):1561–1573.
- 391 2. Gibala MJ. Using exercise training to understand control of skeletal muscle metabolism.  
392 *Appl Physiol Nutr Metab.* 2017;42(1):108–110.
- 393 3. Pedersen BK, Saltin B. Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as  
394 therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports.* 2015;25(Suppl 3):1–  
395 72.
- 396 4. Ravelojaona M, Féasson L, Oyono-Enguélé S, Vincent L, Djoubairou B, Ewa'Sama  
397 Essoue C, Messonnier LA. Evidence for a profound remodeling of skeletal muscle and  
398 its microvasculature in sickle cell anemia. *Am J Pathol.* 2015;185(5):1448–1456.
- 399 5. Dougherty KA, Schall JI, Rovner AJ, Stallings VA, Zemel BS. Attenuated maximal  
400 muscle strength and peak power in children with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol*  
401 *Oncol.* 2011;33(2):93–97.
- 402 6. Ohara DG, Ruas G, Walsh IAP, Castro SS, Jamami M. Lung function and six-minute  
403 walk test performance in individuals with sickle cell disease. *Braz J Phys Ther.*  
404 2014;18(1):79–87.
- 405 7. Connes P, Machado R, Hue O, Reid H. Exercise limitation, exercise testing and exercise  
406 recommendations in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2011;49(1-4):151–  
407 163.
- 408 8. Merlet AN, Chatel B, Hourdé C, Ravelojaona M, Bendahan D, Féasson L, Messonnier  
409 LA. How Sick Cell Disease Impairs Skeletal Muscle Function: Implications in Daily  
410 Life. *Med Sci Sports Exerc.* 2018.
- 411 9. Bergeron MF, Cannon JG, Hall EL, Kutlar A. Erythrocyte sickling during exercise and  
412 thermal stress. *Clin J Sport Med.* 2004;14(6):354–356.
- 413 10. Martin C, Pialoux V, Faes C, Charrin E, Skinner S, Connes P. Does physical activity  
414 increase or decrease the risk of sickle cell disease complications? *Br. J Sports Med.*  
415 2018;52(4):214–218.
- 416 11. Waked IS. Recommended Physical Therapy Program for Improving Quality of Life for  
417 Patients with Sick Cell Anemia. *Int J Health Sci Res.* 2017;7:163–173.
- 418 12. Liem RI, Akinosun M, Muntz DS, Thompson AA. Feasibility and safety of home  
419 exercise training in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2017;64(12).
- 420 13. Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes M-C, Rudnicki MA. Satellite Cells and Skeletal  
421 Muscle Regeneration. *Comp Physiol.* 2015;5(3):1027–1059.

- 422 14. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol*  
423 *Rev.* 2013;93(1):23–67.
- 424 15. Abreu P, Mendes SVD, Ceccatto VM, Hirabara SM. Satellite cell activation induced by  
425 aerobic muscle adaptation in response to endurance exercise in humans and rodents.  
426 *Life Sci.* 2017;170:33–40.
- 427 16. Charifi N, Kadi F, Féasson L, Denis C. Effects of endurance training on satellite cell  
428 frequency in skeletal muscle of old men. *Muscle Nerve.* 2003;28(1):87-92.
- 429 17. Hoedt A, Christensen B, Nellemann B, Mikkelsen UR, Hansen M, Schjerling P, Farup  
430 J. Satellite cell response to erythropoietin treatment and endurance training in healthy  
431 young men. *J. Physiol.* 2016;594(3):727–743.
- 432 18. Joannis S, Gillen JB, Bellamy LM, McKay BR, Tarnopolsky MA, Gibala MJ, Parise  
433 G. Evidence for the contribution of muscle stem cells to nonhypertrophic skeletal  
434 muscle remodeling in humans. *FASEB J.* 2013;27(11):4596–4605.
- 435 19. Verney J, Kadi F, Charifi N, Féasson L, Saafi MA, Castells J, Piehl-Aulin K, Denis C.  
436 Effects of combined lower body endurance and upper body resistance training on the  
437 satellite cell pool in elderly subjects. *Muscle Nerve.* 2008;38(3):1147–1154.
- 438 20. Henriksson KG. “Semi-open” muscle biopsy technique. A simple outpatient procedure.  
439 *Acta Neurol Scand.* 1979;59(6):317–323.
- 440 21. Snijders T, Nederveen JP, McKay BR, Joannis S, Verdijk LB, van Loon LJC., Parise  
441 G. Satellite cells in human skeletal muscle plasticity. *Front Physiol.* 2015;6:283.
- 442 22. Mackey AL, Kjaer M, Charifi N, Henriksson J, Bojsen-Moller J, Holm L, Kadi F.  
443 Assessment of satellite cell number and activity status in human skeletal muscle  
444 biopsies. *Muscle Nerve.* 2009;40(3):455–465.
- 445 23. Bankolé L-C, Feasson L, Ponsot E, Kadi F. Fibre type-specific satellite cell content in  
446 two models of muscle disease. *Histopathology.* 2013;63(6):826–832.
- 447 23. Murach KA, Fry CS, Kirby TJ, Jackson JR, Lee JD, White SH, Dupont-Versteegden  
448 EE, McCarthy JJ, Peterson CA. Starring or Supporting Role? Satellite Cells and Skeletal  
449 Muscle Fiber Size Regulation. *Physiol (Bethesda).* 2018;33(1):26–38.
- 450 24. Murach KA, Englund DA, Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ, Peterson CA.  
451 Myonuclear Domain Flexibility Challenges Rigid Assumptions on Satellite Cell  
452 Contribution to Skeletal Muscle Fiber Hypertrophy. *Front Physiol.* 2018;9:635.
- 453 25. Joannis S, McKay BR, Nederveen JP, Scribbans TD, Gurd BJ, Gillen JB, Gibala MJ,  
454 Tarnopolsky M, Parise G. Satellite cell activity, without expansion, after  
455 nonhypertrophic stimuli. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.*

456 2015;309(9):R1101–R1111.

457 26. Nederveen JP, Joanisse S, Séguin CML, Bell KE, Baker SK, Phillips SM, Parise G. The  
458 effect of exercise mode on the acute response of satellite cells in old men. *Acta Physiol*  
459 *Oxf.* 2015;215(4):177–190.

460 27. Nederveen JP, Joanisse S, Snijders T, Thomas AC, Kumbhare D, Parise G. The  
461 influence of capillarization on satellite cell pool expansion and activation following  
462 exercise-induced muscle damage in healthy young men. *J Physiol.* 2018.

463

464

465

466

467 **Figure legends**

468

469 **Figure 1.** Characterization of the variation of the CSA, the myonuclear content, and the SC content. (A)  
470 Representation of serial the cross-sections analysis for the fiber-type analysis. The first serial slide (S1) shows  
471 BA-D5 staining (red) used to determine the fiber type (BA-D5<sup>+</sup> fibers were considered as type I fibers, and BA-  
472 D5<sup>-</sup> fibers were considered as type II fibers). The second slide (S2) shows the nuclei (DAPI, blue), and the SCs  
473 (CD56, green) labelings. In both slides, laminin (in green and red respectively for S1 and S2) was used to determine  
474 the fibers limits. Numbers indicate muscle fibers types I or II. Yellow arrows point at satellite cells, and white  
475 arrows points at myonuclei. Mean absolute changes in (B) fiber CSA and (C) fiber SC content.  
476

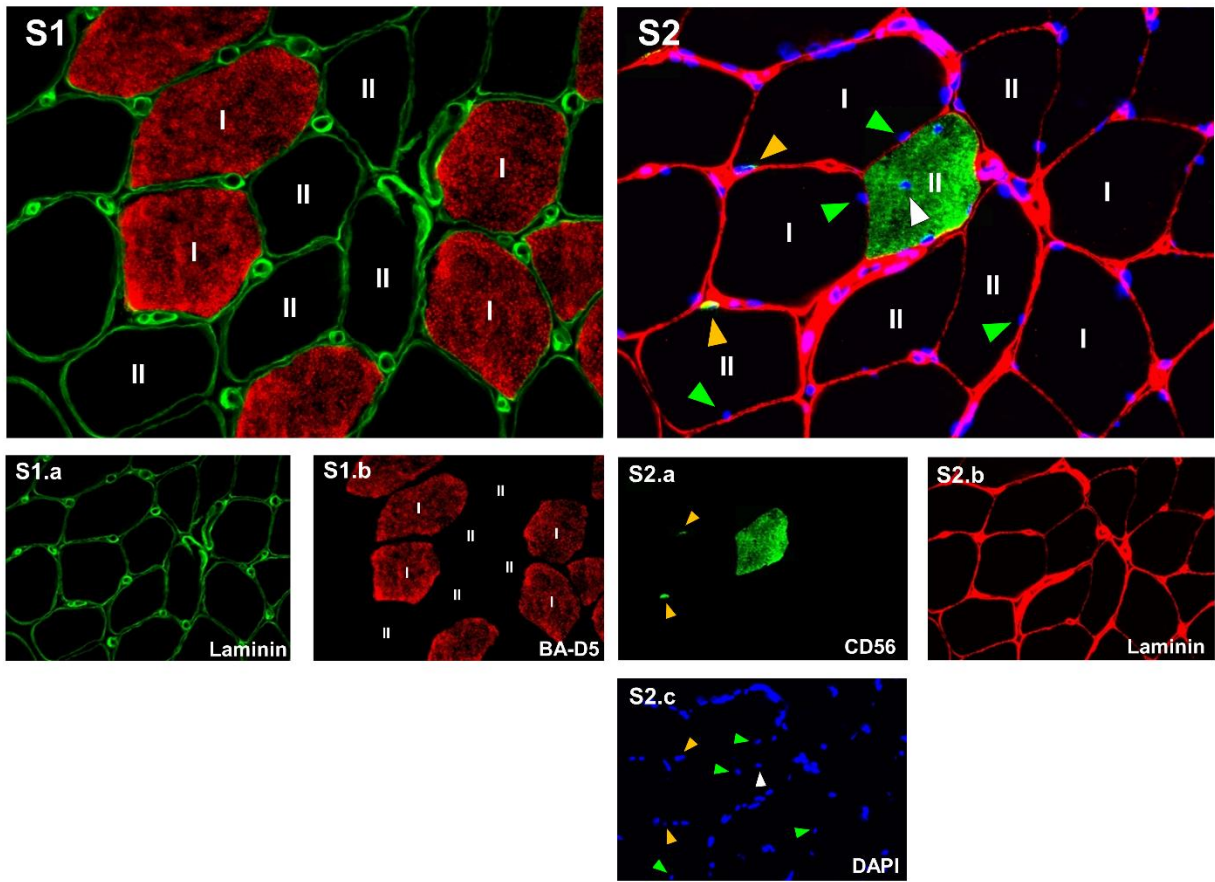
477 **Figure 2.** Characterization of the proliferating satellite cells. Representation of the serial cross-sections analysis  
478 for the fiber-type analysis of proliferating satellite cells. The first serial slide (S1) shows BA-D5 staining (red)  
479 used to determine the fiber type (BA-D5<sup>+</sup> fibers were considered as type I fibers, and BA-D5<sup>-</sup> fibers were  
480 considered as type II fibers). Slide 2 (S2) shows satellite cells (CD56, red), proliferating cells (Ki67, green) and  
481 nuclei (DAPI, blue). Numbers indicate muscle fibers types I or II. Arrows point at proliferating satellite cells.  
482

483 **Tables legends**

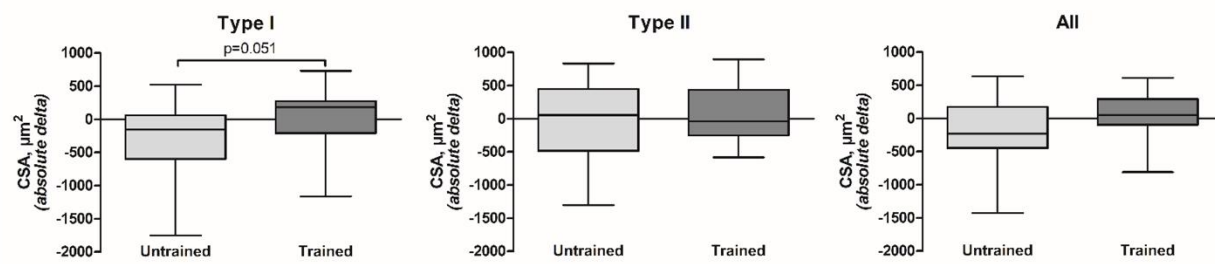
484 **Table 1.** Baseline muscle characteristics of untrained and trained SCD patients. Values are presented as mean  
485 (SEM) or median [IQR]. CSA, cross-sectional area; SC, satellite cells. \* P<0.05, different from untrained subjects.  
486 \$Values are percentage of subjects showing histologic signs (number of subjects).  
487

488 **Table 2.** Changes in muscle characteristics and regenerative potential of untrained and trained SCD patients.  
489 Values are presented as mean (SD) or median [IQR]. CSA, cross-sectional area; SC, satellite cells; NA, non-  
490 adaptable. \* P<0.05, different from untrained subjects.

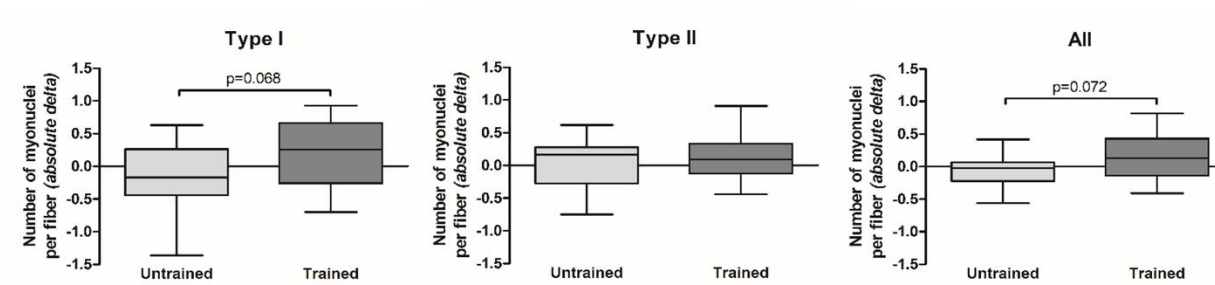
**A**



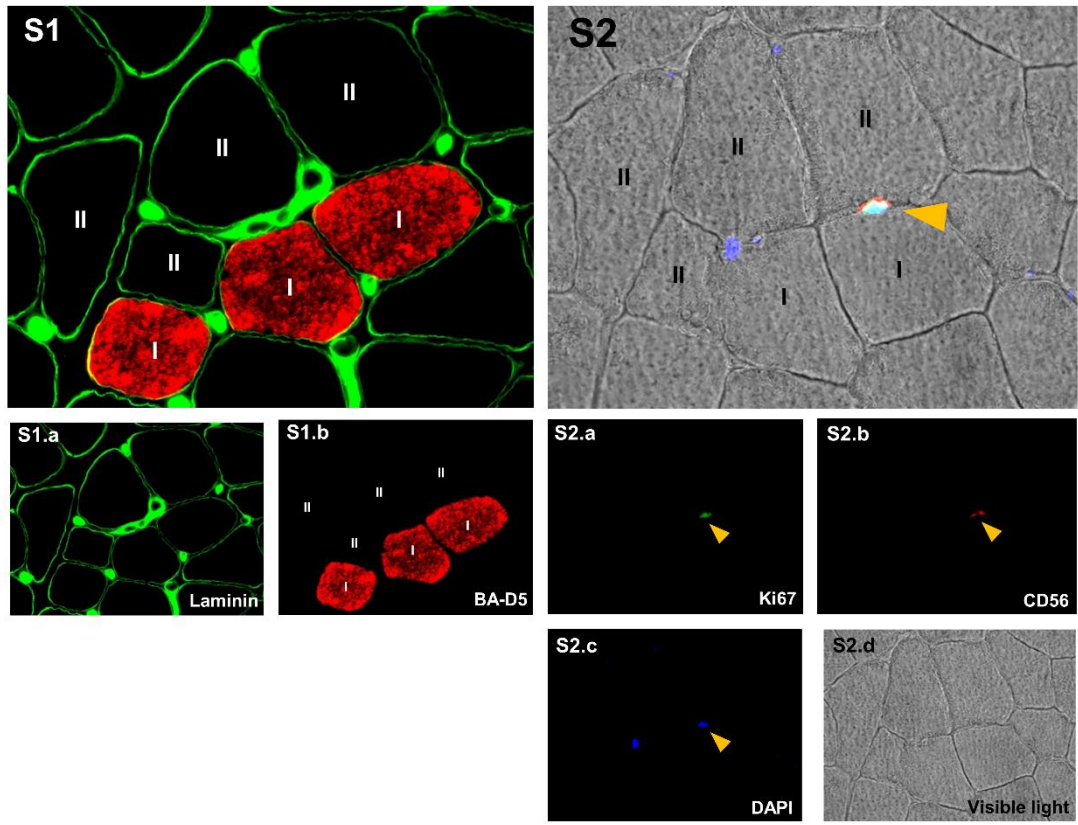
**B**



**C**



**A**



**Table 1**

<b>Variables</b>	<b>All N=33</b>	<b>Untrained N=18</b>	<b>Trained N=15</b>	<b>p-value</b>
<b><i>Fiber CSA, <math>\mu\text{m}^2</math></i></b>				
Type I	3,083 (182)	2,888 (252)	3,316 (259)	0.247
Type II	2,575 (134)	2,495 (188)	2,671 (192)	0.519
All	2,829 (136)	2,709 (201)	2,973 (175)	0.341
<b><i>Myonuclei per fiber, %</i></b>				
Type I	2.22 (0.11)	2.17 (0.15)	2.28 (0.17)	0.645
Type II	1.98 (0.09)	1.98 (0.14)	1.99 (0.09)	0.945
All	2.11 (0.08)	2.08 (0.13)	2.14 (0.10)	0.703
<b><i>Myonuclear domain, <math>\mu\text{m}^2</math></i></b>				
Type I	1,466 (54)	1,334 [1,217;1,406]	1,528 [1,350;1,804]*	<b>0.039</b>
Type II	1,389 (59)	1,356 (315)	1,429 (378)	0.552
All	1,434 (52)	1,309 [1,250;1,497]	1,441 [1,259;1,653]	0.247
<b><i>SC per fiber, %</i></b>				
Type I	8.19 (0.65)	7.84 (0.84)	8.61 (1.04)	0.562
Type II	3.95 [2.91;6.36]	3.73 [2.74;4.62]	5.50 [3.81;8.14]*	<b>0.033</b>
All	6.30 [4.85;8.89]	5.36 [4.59;7.14]	7.37 [4.94;9.47]	0.148
<b><i>Migrating SC per SC, %</i></b>				
	6.67 [0.00;11.76]	8.33 [0.00;11.6]	5.88 [0.00;11.81]	0.745
<b><i>Proliferating SC per SC, %</i></b>				
Type I	0.00 [0.00;0.00]	0.00 [0.00;0.00]	0.00 [0.00;0.00]	0.761
Type II	0.00 [0.00;0.00]	0.00 [0.00;0.00]	0.00 [0.00;0.00]	0.691
All	0.00 [0.00;0.00]	0.00 [0.00;0.00]	0.00 [0.00;1.56]	0.828
<b><i>Regenerating fiber per fiber, %</i></b>				
Type I	0.00 [0.00;1.48]	0.96 [0.00;3.35]	0.00 [0.00;0.59]	0.219
Type II	0.56 [0.00;1.91]	0.68 [0.00;1.57]	0.56 [0.00;1.96]	1.000
All	0.61 [0.00;1.55]	0.69 [0.00;1.98]	0.61 [0.14;1.25]	0.745
<b><i>Internalized nuclei per fiber, %</i></b>				
Type I	0.00 [0.00;0.00]	0.00 [0.00;0.00]	0.00 [0.00;0.00]	0.800
Type II	0.61 [0;1.26]	0.53 [0.00;1.30]	0.64 [0.00;1.17]	0.857
All	0.46 [0;0.97]	0.49 [0.00;1.22]	0.46 [0.00;0.86]	0.814
<b><i>Segmented fibers</i></b>				
<b><i>Necrotic fibers</i></b>				
	0 (0)	0 (0)	0 (0)	



**Table 2**

<b>Variables</b>	<b>Untrained</b> Δ absolute	<b>Trained</b> Δ absolute	<b>p-value</b>
<b><i>Fiber CSA, μm<sup>2</sup></i></b>			
Type I	-157 [-483;30]	181 [-125;251]	<b>0.051</b>
Type II	-55 (590)	66 (402)	0.505
All	-231 (569)	15 (403)	0.171
<b><i>Myonuclei per fiber, %</i></b>			
Type I	-14.1 (49.6)	18.3 (48.5)	<b>0.068</b>
Type II	4.35 (35.4)	12.5 (32.6)	0.500
All	-5.78 (27.0)	13.8 (33.4)	<b>0.072</b>
<b><i>Myonuclear domain, μm<sup>2</sup></i></b>			
Type I	-81,6 (232)	-167 (461)	NA
Type II	-81,1 (258)	-93,4 (330)	0.905
All	-81,9 (204)	-131 (346)	0.614
<b><i>SC per fiber, %</i></b>			
Type I	1.44 (5.38)	0.10 (5.38)	0.481
Type II	1.37 (2.91)	-1.07 (3.41)*	NA
All	0.85 (3.49)	-0.61 (3.29)	0.229
<b><i>Migrating SC per SC, %</i></b>	1.67 (13.2)	1.19 (7.83)	0.903
<b><i>Proliferating SC per SC, %</i></b>			
Type I	0.00 [0.00;0.00]	0.00 [0.00;0.00]	0.649
Type II	0.00 [0.00;0.00]	0.00 [0.00;0.00]	0.890
All	0.00 [0.00;0.00]	0.00 [0.00;4.19]	0.294
<b><i>Regenerating fiber per fiber, %</i></b>			
Type I	-0,25 [-1,45;1,38]	0,62 [0;1,36]	0.347
Type II	0 [-0,91;0,66]	0 [-0,44;0,78]	0.691
All	-0,11 [-1,23;0,55]	0,33 [-0,28;1,14]	0.153
<b><i>Internalized nuclei per fiber, %</i></b>			
Type I	0.00 [0.00;0.03]	0.00 [0.00;0.50]	0.828
Type II	0.00 [-0.64;0.30]	0.00 [-0.46;0.37]	0.857
All	-0.17 (0.93)	0.06 (0.98)	0.490

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

# 1. Conclusion

Dans certaines régions du monde, la drépanocytose représente un problème majeur de santé publique. A l'heure actuelle la thérapie génique démontre pour la première fois son efficacité (Ribeil et al. 2017), mais au-delà du coût de cette thérapeutique qui reste très élevé, son efficacité et les effets secondaires sur le long terme restent également à déterminer. De plus, les pays les plus touchés par cette pathologie n'ont souvent pas accès aux traitements les plus avancés. Dans ce contexte, l'idée du projet « ExDre » était de proposer une stratégie thérapeutique, certes palliative, mais novatrice, réalisable et accessible aux patients drépanocytaires. Basée sur la pratique d'une activité physique adaptée, l'objectif était de dépasser le paradigme actuel selon lequel le sport et tout exercice physique sans distinction constituent un facteur de risque pour les patients drépanocytaires. L'hypothèse était qu'une activité physique, adaptée et contrôlée, permettrait d'améliorer la capacité physique et la fonction musculaire des patients, ce qui pourrait contribuer à accroître leur autonomie et leur qualité de vie.

Les résultats des études présentées dans ce manuscrit démontrent clairement le potentiel thérapeutique pour ces patients, de ce type d'accompagnement. En effet, l'étude princeps montre qu'un entraînement en endurance standardisé, supervisé et adapté aux capacités du patient drépanocytair, est sans danger pour celui-ci, et que ce type d'entraînement améliore les capacités fonctionnelles, en particulier pour des intensités d'exercice proches de celles requises dans la vie quotidienne. De plus, ce type d'entraînement conduit à des corrections des perturbations du tissu musculaire squelettique préalablement observées dans cette pathologie (Ravelojaona et al. 2015) (Tableau 6). En premier lieu, une amélioration de la vascularisation et potentiellement de l'oxygénation musculaire a été observée chez les patients entraînés, notamment grâce à une augmentation du nombre de microvaisseaux (étude 1). Une amélioration des caractéristiques structurales (diminution de l'hypotrophie) et de la capacité métabolique oxydative musculaire a ensuite été rapportée chez les patients ayant suivi l'entraînement (étude 2). Ces bénéfices tissulaires et fonctionnels semblent se répercuter sur la qualité de vie des patients comme en témoigne le questionnaire SF-36 qui rapporte une amélioration des dimensions « vitalité » et « bien-être émotionnel » des patients entraînés (étude princeps). Il est également intéressant d'observer que l'innocuité constatée pour ce type d'entraînement repose notamment sur une faible mobilisation des voies anaérobies : i) sollicitation restreinte de la glycolyse lactique (diminution des concentrations sanguines du lactate pour une intensité donnée ou décalage vers la droite de la courbe de la lactatémie en fonction de l'intensité de l'exercice, étude princeps), ii) stabilité des activités enzymatiques associées (MK, CK, ENO et LDH) et iii) absence de modification des protéines impliquées dans la régulation du pH (CAII, CAIII, MCT1 et MCT4) (étude 2). Par ailleurs, cet

entraînement n'a pas engendré de dégradation tissulaire notable (étude 3). Ainsi, les résultats du programme de recherche transversal et intégratif renforcent l'idée que ce programme d'entraînement semble être sans danger pour les patients drépanocytaires et pour leurs tissus musculaires.

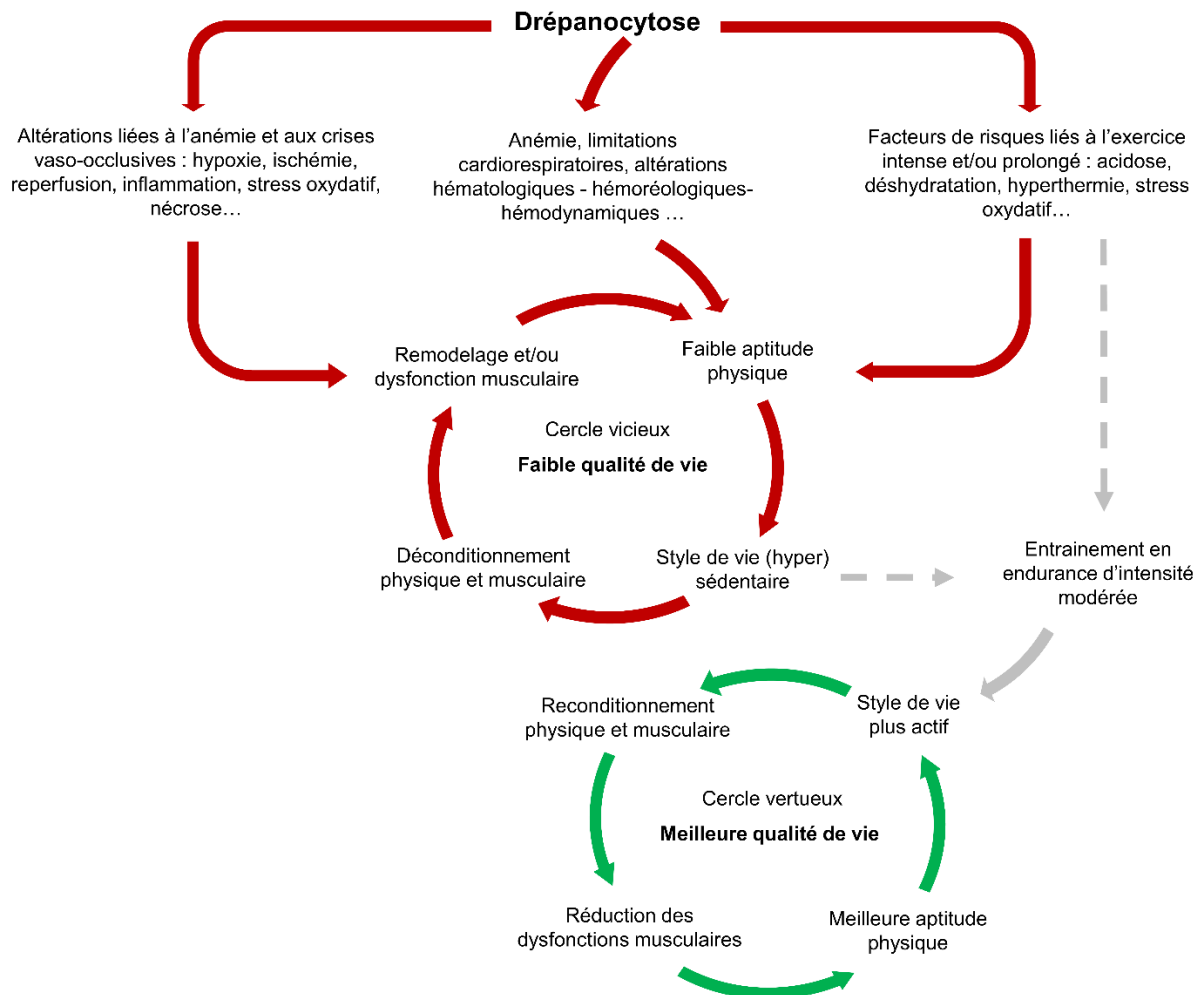
**Tableau 6 : Synthèse des adaptations musculaires tissulaires et fonctionnelles des patients drépanocytaires en réponse à l'entraînement en endurance.**

Caractéristiques tissulaires et fonctionnelles du muscle squelettique	Patient drépanocytaire vs sujet sain à l'état basal	Patient drépanocytaire après entraînement
<b>Au niveau tissulaire</b>		
<b>Au niveau structural</b>		
Surface pour 100 fibres, mm <sup>2</sup>	↓ ↓ (-34%) <sup>a</sup>	↑ (+5%) <sup>d</sup>
Fibres I, %	↑ ↑ (+39%) <sup>a</sup>	↔ <sup>d</sup>
<b>Au niveau microvasculaire</b>		
Densité capillaire, cap.mm <sup>2</sup>	↓ ↓ ↓ (-19%) <sup>a</sup>	↑ ↑ (+17%) <sup>e</sup>
Surface des capillaires, μm <sup>2</sup>	↑ ↑ (+43%) <sup>a</sup>	↔ <sup>e</sup>
Tortuosité des capillaires, U.A.	↓ ↓ ↓ (-43%) <sup>a</sup>	↔ <sup>e</sup>
Diamètre des capillaires, μm	↑ ↑ ↑ (+50%) <sup>a</sup>	↔ <sup>e</sup>
Nombre de capillaires par fibre	↓ ↓ ↓ (-45%) <sup>a</sup>	↑ ↑ (+18%) <sup>e</sup>
LC/PF, %	↔ <sup>a</sup>	↑ ↑ ↑ (+42%) <sup>e</sup>
<b>Au niveau énergétique</b>		
Activités enzymatiques		
Myokinase	↔ <sup>a</sup>	↔ <sup>d</sup>
Créatine kinase	↓ ↓ (-14%) <sup>a</sup>	↔ <sup>d</sup>
Phosphofructokinase	↔ <sup>a</sup>	na
Enolase	na	↔ <sup>d</sup>
Lactate déshydrogénase	↔ <sup>a</sup>	↔ <sup>d</sup>
Citrate synthase	↓ ↓ ↓ (-31%) <sup>a</sup>	↑ ↑ ↑ (+28%) <sup>d</sup>
β-Hydroxyacyl-CoA-Déshydrogénase	↓ ↓ ↓ (-30%) <sup>a</sup>	↑ ↑ (+20%) <sup>d</sup>
Complexe II de la chaîne respiratoire	na	↔ <sup>d</sup>
Complexe IV de la chaîne respiratoire	na	↑ (+31%) <sup>d</sup>
Activités histoenzymatiques		
Cytochrome C oxidase type I	↔ <sup>a</sup>	↑ (+11%) <sup>d</sup>
Cytochrome C oxidase type IIA	↓ (-7%) <sup>a</sup>	↔ <sup>d</sup>
Cytochrome C oxidase type IIX	↓ (-10%) <sup>a</sup>	↔ <sup>d</sup>
<b>Au niveau fonctionnel</b>		
Force musculaire, kg	↓ ↓ (-16%) <sup>b</sup>	↔ <sup>f</sup>
Puissance pic, watt	↓ ↓ ↓ (-24%) <sup>b</sup>	↑ ↑ ↑ (+45%) <sup>g</sup>
Index de fatigue à l'exercice d'intensité modérée, %	↔ <sup>c</sup>	↔ <sup>f</sup>
Index de fatigue à l'exercice d'intensité intense, %	↓ ↓ <sup>c</sup>	na

↑, les valeurs augmentent ; ↓, les valeurs diminuent ; ↑ ou ↓, légère adaptation ; ↑ ↑ ou ↓ ↓, changement modéré ; ↑ ↑ ↑ ou ↓ ↓ ↓, changement important ; na, non-analysé <sup>a</sup> données extraites de l'étude de Ravelojaona et al. (2015) ; <sup>b</sup> données extraites de l'étude de Dougherty et al. (2011) ; <sup>c</sup> données extraites de l'étude de Chatel et al. (2017) ; <sup>d</sup> données extraites de Merlet et al. *in progress* (étude 2) ; <sup>e</sup> données extraites de Merlet et al. *in progress* (étude 1) ; <sup>f</sup> données non présentées dans le manuscrit ; <sup>g</sup> donnée extraite de Gellen et al. (étude « princeps »). <sup>a</sup>Données non présentées dans le manuscrit.

Pour conclure, la pratique régulière d'une activité physique adaptée, même modérée, permet d'améliorer l'aptitude physique et de corriger en partie les perturbations musculaires observées chez des patients drépanocytaires. Ce schéma de reconditionnement physique et musculaire semble non seulement interrompre le cercle vicieux de l'intolérance à l'effort de

ces patients, exacerbé par leur sédentarité, mais également les entrainer vers un cercle vertueux, susceptible de leur apporter une meilleure qualité de vie (Figure 35). Dans ce contexte, un entraînement en endurance réalisé à une intensité modérée pourrait être considéré comme un « traitement adjuvant de fond » de la drépanocytose, comme cela est déjà le cas pour de nombreuses autres maladies chroniques, cardiovasculaires et métaboliques.



**Figure 35 : Du cercle vicieux au cercle vertueux : schématisation des bénéfices liés à la pratique d'une activité physique adaptée chez le patient drépanocytaire.**

## 2. Perspectives

L'entraînement de 8 semaines proposé dans ce manuscrit a été suffisamment long pour en observer des bénéfices fonctionnels et tissulaires analogues à l'adaptation physiologique à l'exercice habituel. Néanmoins, l'envisager sur un plus long terme pourrait revêtir un effet potentiellement protecteur vis à vis du déclenchement d'évènements indésirables (crises vaso-occlusives) (étude princeps) et plus largement des processus physiopathologiques de la drépanocytose. Dans ce contexte, il pourrait être pertinent de proposer ce mode

d'entraînement en endurance à domicile et contrôlé par un suivi rapproché. L'éducation thérapeutique du patient pour la pratique de ce type d'effort physique adaptée permettra de progressivement l'autonomiser pour cette activité.

Cependant, en l'état actuel des résultats obtenus et de leurs interprétations, plusieurs interrogations demeurent et nous incitent à approfondir ces analyses, notamment en ce qui concerne l'angiogénèse, la biogénèse mitochondriale et le métabolisme énergétique. L'objectif étant de mieux comprendre les mécanismes adaptatifs dans ce contexte physiopathologique spécifique. Ainsi, plusieurs analyses complémentaires nous semblent pertinentes :

- Tout d'abord, l'analyse du réseau microvasculaire des muscles des patients drépanocytaires en réponse à l'entraînement semble permettre l'amélioration de l'oxygénation du tissu par un processus de néo-vascularisation conduisant à la création de nouveaux microcapillaires (étude 1). Bien que ces résultats se basent sur une analyse histologique du réseau microvasculaire comportant la mesure de nombreux indices, il serait intéressant de confirmer ce mécanisme angiogénique par l'étude de marqueurs spécifiques, tels que : VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et FGF (*fibroblast growth factor*). Par ailleurs, l'analyse tri-dimensionnelle au moyen d'un microscope confocale de la structure du réseau microvasculaire en réponse à l'entraînement, est d'intérêt étant donné les importants remodelages observés au niveau de la morphologie des capillaires des patients drépanocytaires (élargissement et diminution de la tortuosité des microvaisseaux) (Ravelojaona et al. 2015). En effet, la mesure de l'épaisseur, la densité et le volume de la membrane basale des cellules endothéliales et l'observation des péricytes pourraient être intéressantes pour la compréhension des mécanismes angiogéniques dans ce contexte physiopathologique particulier.

- Les résultats de l'étude 2 ont rapporté une nette augmentation des activités enzymatiques oxydatives et du contenu musculaire des sous-unités de plusieurs complexes de la chaîne respiratoire. Ces résultats tendent à montrer que, bien qu'il soit d'une intensité très modérée, cet entraînement en endurance influence tout de même la biogénèse mitochondriale. Récemment, l'étude de Meinild Lundby et al. (2017) a observé une forte corrélation entre le volume du réseau mitochondrial et l'activité de la citrate synthase (CS). Nos résultats actuels sont encore insuffisants pour confirmer une possible biogénèse mitochondriale, c'est pourquoi, d'autres analyses telles que la mesure de l'expression du peroxisome proliférateur activé par le récepteur gamma coactivateur 1-alpha (PGC1 $\alpha$ ) et le facteur de transcription mitochondrial A (Tfam), 2 régulateurs clés de ce processus (Lira et al. 2010 ; Ljubicic et al. 2010), pourraient nous donner des informations supplémentaires. De plus, puisque les mitochondries forment un réseau dynamique, dont l'abondance, la taille, la distribution et la morphologie sont continuellement réarrangées par biogenèse, motilité, fusion et fission, l'analyse de certains de ces mécanismes sous-jacents serait également pertinente en ce contexte physiopathologique.

A titre d'exemples, l'étude des protéines responsables de la fusion (*Mfn2*, *mitofusin-2* et *OPA1*, *optic atrophy type 1*, protéines respectives de la membrane mitochondriale externe et interne) (Ding & Yin, 2012) et celle de la fission (*DRP1*, *dynamamin-related protein 1* et *Fis1*, *mitochondrial fission 1 protein*) des mitochondries pourraient nous renseigner sur la dynamique des mitochondries en réponse à cet entraînement chez des patients drépanocytaires.

- Parallèlement, les résultats de l'étude 2 concernant le métabolisme énergétique et plus particulièrement ceux de l'analyse de la chaîne respiratoire, nous incitent à encore approfondir pour mieux appréhender les mécanismes sous-jacents. En effet, l'observation des rapports enzymes/protéines pour les complexes II (CII) et IV (CIV) de la chaîne respiratoire révèle une diminution significative du rapport  $CII_{enz}/CII_{prot}$ , chez les patients entraînés ( $CII_{enz}$  : -1% ;  $CII_{prot}$  : +12%,  $p < 0,05$ ), alors que le rapport  $CIV_{enz}/CIV_{prot}$  demeure constant après l'entraînement ( $CIV_{enz}$  : +31% ;  $CIV_{prot}$  : +25%). En revanche, aucune modification de ces rapports n'a été observée pour le groupe contrôle. Cette diminution du rapport  $CII_{enz}/CII_{prot}$  pourrait supposer une diminution de l'efficacité de l'enzyme CII après entraînement. Egalement, la coloration histoenzymatique COx (cytochrome c oxydase) / SDH (succinate déshydrogénase) a révélé plusieurs fibres bleues (COx-/SDH+) chez plus de la moitié des patients à l'état basal, témoignant de la « non-proportionnalité » des 2 activités oxydatives pour ces myocytes sur cette préparation histologique mixte. Cette observation met en évidence à l'état basal, un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire chez les patients drépanocytaires. En réponse à l'entraînement, le nombre de fibres bleues (COx-/SDH+) est demeuré constant mais cette technique histologique n'est probablement pas suffisamment sensible pour d'observer les adaptations de la chaîne respiratoire. En outre, l'analyse du stress oxydant, des marqueurs antioxydants et des coenzymes (NADH et FAD), pourrait nous apporter des éléments d'interprétation supplémentaires.

- Enfin, l'étude des relations entre cellules satellites et microcirculation pourrait également apporter des éléments d'analyse additionnels pour une meilleure interprétation des données de l'étude 3. En effet, la microcirculation est un facteur important de l'activation des cellules satellites. Ces dernières, lorsqu'elles sont quiescentes, sont fréquemment situées dans une niche anatomique où les micro-vaisseaux sont également présents (Christov et al. 2007). L'activation des cellules satellites semble en partie dépendre de leurs liens avec la microcirculation (Nederveen et al. 2018). Dans l'étude 1, nous avons montré que l'entraînement en endurance augmentait la densité des capillaires dans le muscle des patients drépanocytaires, en conséquence, il serait intéressant d'étudier conjointement l'activation des cellules satellites et l'apparition de néo-capillaires, et de vérifier s'il existe une corrélation entre les 2 phénomènes.

Si ces analyses complémentaires sont nécessaires afin de comprendre les mécanismes adaptatifs musculaires observés chez les patients drépanocytaires en réponse à

l'entraînement, il serait également intéressant de créer de nouveaux protocoles permettant de tester l'efficacité conjointe de cet entraînement avec d'autres traitements. A titre d'exemple, l'hydroxyurée est un traitement connu pour nettement améliorer le profil clinique des patients drépanocytaires. Comme l'hydroxyurée augmente la synthèse d'hémoglobine F et donc l'approvisionnement en oxygène, nous pourrions penser que l'action conjointe de l'entraînement adapté en endurance avec l'hydroxyurée permettrait de potentialiser les effets adaptatifs au niveau de la fonction et du tissu musculaire des patients.



# RÉFÉRENCES

- Abe H. (2000). Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. *Biochemistry (Mosc)* **65**, 757-765.
- Abreu P, Mendes SV, Ceccatto VM, Hirabara SM. (2017). Satellite cell activation induced by aerobic muscle adaptation in response to endurance exercise in humans and rodents. *Life Sci* **170**, 33-40.
- Abreu P. (2018). Bioenergetics mechanisms regulating muscle stem cell self-renewal commitment and function. *Biomed Pharmacother* **103**, 463-472.
- Adachi K, Asakura T. (1984). Polymerization of AS hybrid hemoglobin. Potent inhibitory effect of hemoglobin A on the polymerization of AS hybrid hemoglobin. *J Biol Chem* **259**, 2108-2112.
- Adams RH, Alitalo K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 464-78.
- Ahmed S, Shahid RK, Russo LA. (2005). Unusual causes of abdominal pain: sickle cell anemia. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **19**, 297-310.
- Aickin CC, Thomas RC. (1977). An investigation of the ionic mechanism of intracellular pH regulation in mouse soleus muscle fibres. *J Physiol* **273**, 295-316.
- Aird WC. (2004). Endothelium as an organ system. *Crit Care Med* **32**, S271-9.
- Allison AC. (1954). The distribution of the sickle-cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **48**, 312-8.
- Ama PF, Simoneau JA, Boulay MR, Serresse O, Thériault G, Bouchard C. (1986). Skeletal muscle characteristics in sedentary black and Caucasian males. *J Appl Physiol (1985)* **61**, 1758-61.
- Andersen P, Henriksson J. (1977). Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise. *J Physiol* **270**, 677-90.
- Andersen P. (1975). Capillary density in skeletal muscle of man. *Acta Physiol Scand* **95**, 203-205.
- Anthi A, Machado RF, Jison ML, Taveira-Dasilva AM, Rubin LJ, Hunter L, Hunter CJ, Coles W, Nichols J, Avila NA, Sachdev V, Chen CC, Gladwin MT. (2007). Hemodynamic and functional assessment of patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **175**, 1272-9.
- Ataga KI, Moore CG, Hillery CA, Jones S, Whinna HC, Strayhorn D, Sohler C, Hinderliter A, Parise LV, Orringer EP. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. *Haematologica* **93**, 20-6.
- Baguet A, Bourgois J, Vanhee L, Achten E, Derave W. (2010). Important role of muscle carnosine in rowing performance. *J Appl Physiol (1985)* **109**, 1096-101.
- Balayssac-Siransy E, Connes P, Tuo N, Danho C, Diaw M, Sanogo I, Hardy-Dessources MD, Samb A, Ballas SK, Bogui P. (2011). Mild haemorheological changes induced by a moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* **154**, 398-407.

- Bankolé LC, Millet GY, Temesi J, Bachasson D, Ravelojaona M, Wuyam B, Verges S, Ponsot E, Antoine JC, Kadi F, Féasson L. (2016). Safety and efficacy of a 6-month home-based exercise program in patients with facioscapulohumeral muscular dystrophy: A randomized controlled trial. *Medicine (Baltimore)* **95**, e4497.
- Barabino GA, Platt MO, Kaul DK. (2010). Sick cell biomechanics. *Annu Rev Biomed Eng* **12**, 345-367.
- Barden EM, Zemel BS, Kawchak DA, Goran MI, Ohene-Frempong K, Stallings VA. (2000). Total and resting energy expenditure in children with sickle cell disease. *J Pediatr* **136**, 73-9.
- Barreiro E, Jaitovich A. (2018). Muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease: molecular basis and potential therapeutic targets. *J Thorac Dis* **10**, S1415-S1424.
- Bartolucci P, Habibi A, Khellaf M, Roudot-Thoraval F, Melica G, Lascaux AS, Moutereau S, Loric S, Wagner-Ballon O, Berkenou J, Santin A, Michel M, Renaud B, Lévy Y, Galactéros F, Godeau B. (2016). Score Predicting Acute Chest Syndrome During Vaso-occlusive Crises in Adult Sickle-cell Disease Patients. *EBioMedicine* **10**, 305-11.
- Baum O, Gübeli J, Frese S, Torchetti E, Malik C, Odriozola A, Graber F, Hoppeler H, Tschanz SA. (2015). Angiogenesis-related ultrastructural changes to capillaries in human skeletal muscle in response to endurance exercise. *J Appl Physiol (1985)* **119**, 1118-26.
- Becker HM, Broer S, Deitmer JW. (2004). Facilitated lactate transport by MCT1 when coexpressed with the sodium bicarbonate cotransporter (NBC) in *Xenopus* oocytes. *Biophys J* **86**, 235-247.
- Becker HM, Deitmer JW. (2008). Nonenzymatic proton handling by carbonic anhydrase II during H<sup>+</sup>-lactate cotransport via monocarboxylate transporter 1. *J Biol Chem* **283**, 21655-21667.
- Becker HM, Klier M, Deitmer JW. (2010). Nonenzymatic augmentation of lactate transport via monocarboxylate transporter isoform 4 by carbonic anhydrase II. *J Membr Biol* **234**, 125-135.
- Becker HM, Klier M, Schuler C, McKenna R, Deitmer JW. (2011). Intramolecular proton shuttle supports not only catalytic but also noncatalytic function of carbonic anhydrase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3071-3076.
- Becklake MR, Griffiths SB, McGregor M, Goldman HI, Schreave JP. (1955). Oxygen dissociation curves in sickle cell anemia and in subjects with the sickle cell trait. *J Clin Invest* **34**, 751-755.
- Belcher JD, Beckman JD, Balla G, Balla J, Vercellotti G. (2010). Heme degradation and vascular injury. *Antioxid Redox Signal* **12**, 233-48.
- Belcher JD, Bryant CJ, Nguyen J, Bowlin PR, Kielbik MC, Bischof JC, Hebbel RP, Vercellotti GM. (2003). Transgenic sickle mice have vascular inflammation. *Blood* **101**, 3953-9.
- Belhassen L, Pelle G, Sediame S, Bachir D, Carville C, Bucherer C, Lacombe C, Galacteros F, Adnot S. (2001). Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilation. *Blood* **97**, 1584-9.
- Berger SA, King WS. (1980). The flow of sickle-cell blood in the capillaries. *Biophys J* **29**, 119-148.

- Bergman BC, Wolfel EE, Butterfield GE, Lopaschuk GD, Casazza GA, Horning MA, Brooks GA. (1999). Active muscle and whole body lactate kinetics after endurance training in men. *J Appl Physiol* (1985) **87**, 1684-96.
- Berthaut I, Guignedoux G, Kirsch-Noir F, de Larouziere V, Ravel C, Bachir D, Galactéros F, Ancel PY, Kunstmann JM, Levy L, Jouannet P, Girot R, Mandelbaum J. (2008). Influence of sickle cell disease and treatment with hydroxyurea on sperm parameters and fertility of human males. *Haematologica* **93**, 988-93.
- Bessis M, Delpech G. (1982). Sickle cell shape and structure: images and concepts (1840-1980). *Blood Cells* **8**, 359-435.
- Bhatia M, Walters MC. (2008). Hematopoietic cell transplantation for thalassemia and sickle cell disease: past, present and future. *Bone Marrow Transplant* **41**, 109-17.
- Bodine SC. (2013). Disuse-induced muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 2200-8.
- Boning D, Strobel G, Beneke R, Maassen N. (2005). Lactic acid still remains the real cause of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R902-903.
- Bookchin RM, Balazs T, Landau LC. (1976). Determinants of red cell sickling. Effects of varying pH and of increasing intracellular hemoglobin concentration by osmotic shrinkage. *J Lab Clin Med* **87**, 597-616.
- Brawley OW, Cornelius LJ, Edwards LR, Gamble VN, Green BL, Inturrisi C, James AH, Laraque D, Mendez M, Montoya CJ, Pollock BH, Robinson L, Scholnik AP, Schori M. (2008). National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: hydroxyurea treatment for sickle cell disease. *Ann Intern Med* **148**, 932-8.
- Breen E, Tang K, Olfert M, Knapp A, Wagner P. (2008). Skeletal muscle capillarity during hypoxia: VEGF and its activation. *High Alt Med Biol* **9**, 158-66.
- Briehl RW, Ewert S. (1973). Effects of pH, 2,3-diphosphoglycerate and salts on gelation of sickle cell deoxyhemoglobin. *J Mol Biol* **80**, 445-458.
- Brodal P, Ingjer F, Hermansen L. (1977). Capillary supply of skeletal muscle fibers in untrained and endurance-trained men. *The American journal of physiology* **232**, H705-712.
- Brooks GA, Mercier J. (1994). Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: the "crossover" concept. *J Appl Physiol* (1985) **76**, 2253-61.
- Brooks GA. (1985). Anaerobic threshold: review of the concept and directions for future research. *Med Sci Sports Exerc* **17**, 22-34.
- Brooks GA. (1998). Mammalian fuel utilization during sustained exercise. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **120**, 89-107.
- Brooks GA. (2002). Lactate shuttle -- between but not within cells? *J Physiol* **541**, 333-4.
- Brooks GA. (2018). The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metab* **27**, 757-785.
- Brown MD, Hudlicka O. (2003). Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases. *Angiogenesis* **6**, 1-14.

- Buckingham M. (2006). Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev* **16**, 525–532.
- Bunn HF. (1997). Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* **337**, 762-9.
- Burgomaster KA, Heigenhauser GJ, Gibala MJ. (2006). Effect of short-term sprint interval training on human skeletal muscle carbohydrate metabolism during exercise and time-trial performance. *J Appl Physiol (1985)* **100**, 2041-7.
- C Juel. (1997). Lactate-proton cotransport in skeletal muscle. *Physiol Rev* **77**, 321-358.
- C Juel. (2008). Regulation of pH in human skeletal muscle: adaptations to physical activity. *Acta Physiol (Oxf)* **193**, 17-24.
- Callahan LA, Woods KF, Mensah GA, Ramsey LT, Barbeau P, Gutin B. (2002). Cardiopulmonary responses to exercise in women with sickle cell anemia. *Am J Respir Crit Care Med* **165**, 1309-16.
- Callender, ST, Powell EO, Witts LJ. (1947). Normal red-cell survival in men and women. *J Pathol Bacteriol* **59**, 519-532.
- Campbell EL, Seynnes OR, Bottinelli R, McPhee JS, Atherton PJ, Jones DA, Butler-Browne G, Narici MV. (2013). Skeletal muscle adaptations to physical inactivity and subsequent retraining in young men. *Biogerontology* **14**, 247-59.
- Capers PL, Hyacinth HI, Cue S, Chappa P, Vikulina T, Roser-Page S, Weitzmann MN, Archer DR, Newman GW, Quarshie A, Stiles JK, Hibbert JM. (2015). Body composition and grip strength are improved in transgenic sickle mice fed a high-protein diet. *J Nutr Sci* **4**, e6.
- Carmeliet P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* **6**, 389-95.
- Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, McMahon RP, Bonds DR. (1995). Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med* **332**, 1317-22.
- Charifi N, Kadi F, Feasson L, Costes F, Geysant A, Denis C. (2004). Enhancement of microvessel tortuosity in the vastus lateralis muscle of old men in response to endurance training. *J Physiol* **554**, 559-569.
- Charifi N, Kadi F, Feasson L, Denis C. (2003). Effects of endurance training on satellite cell frequency in skeletal muscle of old men. *Muscle Nerve* **28**, 87-92.
- Charlot K, Antoine-Jonville S, Moeckesch B, Jumet S, Romana M, Waltz X, Divialle-Doumbo L, Hardy-Dessources MD, Petras M, Tressières B, Tarer V, Hue O, Etienne-Julan M, Connes P. (2017). Cerebral and muscle microvascular oxygenation in children with sickle cell disease: Influence of hematology, hemorheology and vasomotion. *Blood Cells Mol Dis* **65**, 23-28.
- Chasiotis D, Hultman E, Sahlin K. (1983). Acidotic depression of cyclic AMP accumulation and phosphorylase b to a transformation in skeletal muscle of man. *J Physiol* **335**, 197-204.

- Chatel B, Hourdé C, Gondin J, Fouré A, Le Fur Y, Vilmen C, Bernard M, Messonnier LA, Bendahan D. (2017a). Impaired muscle force production and higher fatigability in a mouse model of sickle cell disease. *Blood Cells Mol Dis* **63**, 37-44.
- Chatel B, Messonnier LA, Bendahan D. (2018). Do we have to consider acidosis induced by exercise as deleterious in sickle cell disease? *Exp Physiol* **103**, 1213-1220.
- Chatel B, Messonnier LA, Hourde C, Vilmen C, Bernard M, Bendahan D. (2017b). Moderate and intense muscular exercises induce marked intramyocellular metabolic acidosis in sickle cell disease mice. *J Appl Physiol (1985)* **122**, 1362-69.
- Chirico EN, Faës C, Connes P, Canet-Soulas E, Martin C, Pialoux V. (2016). Role of Exercise-Induced Oxidative Stress in Sickle Cell Trait and Disease. *Sports Med* **46**, 629-39.
- Chirico EN, Martin C, Faës C, Féasson L, Oyono-Enguélé S, Aufradet E, Dubouchaud H, Francina A, Canet-Soulas E, Thiriet P, Messonnier L, Pialoux V. (2012). Exercise training blunts oxidative stress in sickle cell trait carriers. *J Appl Physiol (1985)* **112**, 1445-53.
- Christensen KL, Mulvany MJ. (2001). Location of resistance arteries. *J Vasc Res* **38**, 1-12.
- Chuang ML, Lin IF, Wasserman K. (2001). The body weight-walking distance product as related to lung function, anaerobic threshold and peak VO<sub>2</sub> in COPD patients. *Respir Med* **95**, 618-26.
- Clark JM, Glagov S. (1985). Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited. *Arteriosclerosis* **5**, 19-34.
- Clark MR, Guatelli JC, Mohandas N, Shohet SB. (1980). Influence of red cell water content on the morphology of sickling. *Blood* **55**, 823-830.
- Cocks M, Shaw CS, Shepherd SO, Fisher JP, Ranasinghe A, Barker TA, Wagenmakers AJ. (2016). Sprint interval and moderate-intensity continuous training have equal benefits on aerobic capacity, insulin sensitivity, muscle capillarisation and endothelial eNOS/NAD(P)H oxidase protein ratio in obese men. *J Physiol* **594**, 2307-21.
- Cocks M, Shaw CS, Shepherd SO, Fisher JP, Ranasinghe AM, Barker TA, Tipton KD, Wagenmakers AJ. (2013). Sprint interval and endurance training are equally effective in increasing muscle microvascular density and eNOS content in sedentary males. *J Physiol* **591**, 641-56.
- Coggan AR, Spina RJ, King DS, Rogers MA, Brown M, Nemeth PM, Holloszy JO. (1992). Skeletal muscle adaptations to endurance training in 60- to 70-yr-old men and women. *J Appl Physiol (1985)* **72**, 1780-6.
- Connes P, Machado R, Hue O, Reid H. (2011). Exercise limitation, exercise testing and exercise recommendations in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc* **49**, 151-163.
- Connes P, Sara F, Hardy-Dessources MD, Marlin L, Etienne F, Larifla L, Saint-Martin C, Hue O. (2006). Effects of short supramaximal exercise on hemorheology in sickle cell trait carriers. *Eur J Appl Physiol* **97**, 143-50.
- Connes P, Simmonds MJ, Brun JF, Baskurt OK. (2013). Exercise hemorheology: classical data, recent findings and unresolved issues. *Clin Hemorheol Microcirc* **53**, 187-99.

- Cossu G, Biressi S. (2005). Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration. *Seminars in cell & developmental biology* **16**, 623-631.
- Davis HA, Bassett J, Hughes P, Gass GC. (1983). Anaerobic threshold and lactate turnpoint. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **50**, 383-92.
- Davis JA, Frank MH, Whipp BJ, Wasserman K. (1979). Anaerobic threshold alterations caused by endurance training in middle-aged men. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **46**, 1039-46.
- de Boer MD, Selby A, Atherton P, Smith K, Seynnes OR, Maganaris CN, Maffulli N, Movin T, Narici MV, Rennie MJ. (2007). The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. *J Physiol* **585**, 241-251.
- Degens H, Koşar SN, Hopman MT, de Haan A. (2008). The time course of denervation-induced changes is similar in soleus muscles of adult and old rats. *Appl Physiol Nutr Metab* **33**, 299-308.
- Dericksson B, Tortora J. (2017). *Manuel d'anatomie et de physiologie humaines*. 2<sup>ème</sup> édition. Broché.
- Diggs LW, Ahmann CF, Bibbs J. (1933). The incidence and significance of the sickle cell trait. *Ann Intern Med* **7**, 769-778.
- Ding WX, Yin XM. (2012). Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem* **393**, 547-64.
- Dougherty KA, Bertolaso C, Schall JI, Smith-Whitley K, Stallings VA. (2018). Muscle Strength, Power, and Torque Deficits in Children With Type SS Sickle Cell Disease. *J Pediatr Hematol Oncol* **40**, 348-354.
- Dougherty KA, Schall JI, Rovner AJ, Stallings VA, Zemel BS. (2011). Attenuated maximal muscle strength and peak power in children with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol* **33**, 93-7.
- Duchateau J, Enoka RM. (2011). Human motor unit recordings: origins and insight into the integrated motor system. *Brain Res* **1409**, 42-61.
- Dufu K, Oksenberg D. (2018). GBT440 reverses sickling of sickled red blood cells under hypoxic conditions *in vitro*. *Hematol Rep* **10**, 7419.
- Dufu K, Patel M, Oksenberg D, Cabrales P. (2018). GBT440 improves red blood cell deformability and reduces viscosity of sickle cell blood under deoxygenated conditions. *Clin Hemorheol Microcirc*.
- Egan B, Zierath JR. (2013). Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* **17**, 162-84.
- Eggleton P, Eggleton GP. (1927). The physiological significance of "phosphagen". *J Physiol* **63**, 155-61.
- Ejindu VC, Hine AL, Mashayekhi M, Shorvon PJ, Misra RR. (2007). Musculoskeletal manifestations of sickle cell disease. *Radiographics* **27**, 1005-1021.

- Elbaum D, Nagel RL. (1981). Esterase activity of hemoglobin. Differences between HB A and HB S. *J Biol Chem* **256**, 2280-2283.
- Ellison AM, Shaw K. (2007). Management of vasoocclusive pain events in sickle cell disease. *Pediatr Emerg Care* **23**, 832-8.
- El-Sayed M, Ramadan M. (2004). Immunohistochemical study of some rare vascular tumors. *J Egypt Natl Canc Inst* **16**, 123-129.
- Emhoff CA, Messonnier LA, Horning MA, Fattor JA, Carlson TJ, Brooks GA. (2013). Direct and indirect lactate oxidation in trained and untrained men. *J Appl Physiol (1985)* **115**, 829-38.
- Ergul S, Brunson CY, Hutchinson J, Tawfik A, Kutlar A, Webb RC, Ergul A. (2004). Vasoactive factors in sickle cell disease: in vitro evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction. *Am J Hematol* **76**, 245-51.
- Eriksson E, Myrhage R. (1972). Microvascular dimensions and blood flow in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* **86**, 211-22.
- Evans WJ. (2010). Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. *The American journal of clinical nutrition* **91**, 1123S-1127S.
- Faes C, Balaýssac-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. *Br J Haematol* **164**, 124-30.
- Faes C, Sparkenbaugh EM, Pawlinski R. (2018). Hypercoagulable state in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc* **68**, 301-318.
- Feasson L, Gautheron V, Mosnier J, Antoine J, Damon G, Michel D, Denis C. (1997). "Intérêt de la biopsie musculaire à la pince dans le diagnostic étiologique des pathologies neuromusculaires." *Annales de Réadaptation et de Médecine Physique* **40**, 527-533.
- Ferrando AA, Tipton KD, Bamman MM, Wolfe RR. (1997). Resistance exercise maintains skeletal muscle protein synthesis during bed rest. *J Appl Physiol* **82**, 807-810.
- Fitts RH. Cellular mechanisms of muscle fatigue. (1994). *Physiol Rev* **74**, 49-94.
- Fitzhugh CD, Wigfall DR, Ware RE. (2005). Enalapril and hydroxyurea therapy for children with sickle nephropathy. *Pediatr Blood Cancer* **45**, 982-5.
- Frenette PS. (2002). Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol* **9**, 101-6.
- Freund H, Lonsdorfer J, Oyono-Enguelle S, Lonsdorfer A, Bogui P. (1992). Lactate exchange and removal abilities in sickle cell patients and in untrained and trained healthy humans. *J Appl Physiol* **73**, 2580-7.
- Galactéros F. (1996). [Neonatal detection of sickle cell disease in metropolitan France. Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant (AFDPHE)]. *Arch Pediatr* **3**, 1026-1031.



Gavin TP, Ruster RS, Carrithers JA, Zwetsloot KA, Kraus RM, Evans CA, Knapp DJ, Drew JL, McCartney JS, Garry JP, Hickner RC. (2007). No difference in the skeletal muscle angiogenic response to aerobic exercise training between young and aged men. *J Physiol* **585**, 231-9.

Geers C, Gros G. (2000). Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle. *Physiol Rev* **80**, 681-715.

Gellen B\*, Messonnier LA\*, Galactéros F, Audureau E, Merlet AN, Rupp T, Peyrot S, Martin C, Féasson L\*, Bartolucci P\*. (2018). Moderate-Intensity Endurance-Exercise Training in Sickle Cell Disease Patients without Severe Chronic Complications: a Randomized-Controlled Trial. *The Lancet Haematol*.

Gibala MJ, Little JP, van Essen M, Wilkin GP, Burgomaster KA, Safdar A, Raha S, Tarnopolsky MA. (2006). Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *J Physiol* **575**, 901-11.

Gladden LB. (2007). Is there an intracellular lactate shuttle in skeletal muscle? *J Physiol* **582**, 899.

Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, Brown B, Coles WA, Nichols JS, Ernst I, Hunter LA, Blackwelder WC, Schechter AN, Rodgers GP, Castro O, Ognibene FP. (2004). Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med* **350**, 886-95.

Gladwin MT, Sachdev V. (2012) Cardiovascular abnormalities in sickle cell disease. *J Am Coll Cardiol* **59**, 1123-33.

Gladwin MT, Schechter AN. (2001). Nitric oxide therapy in sickle cell disease. *Semin Hematol* **38**, 333-342.

Gladwin MT, Vichinsky E. (2008). Pulmonary complications of sickle cell disease. *N Engl J Med* **359**, 2254-65.

Gladwin MT. (2006). Role of the red blood cell in nitric oxide homeostasis and hypoxic vasodilation. *Adv Exp Med Biol* **588**, 189-205.

Gouzi F, Préfaut C, Abdellaoui A, Roudier E, de Rigal P, Molinari N, Laoudj-Chenivesse D, Mercier J, Birot O, Hayot M. (2013). Blunted muscle angiogenic training-response in COPD patients versus sedentary controls. *Eur Respir J* **41**, 806-14.

Greenberg MS, Kass EH, Castle WB. (1957). Studies on the destruction of red blood cells. XII. Factors influencing the role of S hemoglobin in the pathologic physiology of sickle cell anemia and related disorders. *J Clin Invest* **36**, 833-843.

Griffin TC, McIntire D, Buchanan GR. (1994). High-dose intravenous methylprednisolone therapy for pain in children and adolescents with sickle cell disease. *N Engl J Med* **330**, 733-7.

Habibi A, Bachir D, Godeau B. (2004). [Acute complications in sickle cell disease]. *Rev Prat* **54**, 1548-56.

Haldane JBS. (1949). Disease and evolution. *Ric. Sci. Suppl* **19**, 68-76.

Halestrap AP, Wilson MC. (2012). The monocarboxylate transporter family-role and regulation. *IUBMB Life* **64**, 109-119.

- Halestrap AP. (2012). The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB Life* **64**, 1-9.
- Halestrap AP. (2013). Monocarboxylic acid transport. *Comprehensive Physiology* **3**, 1611-1643.
- Hansen-Smith FM, Watson L, Lu DY, Goldstein I. (1988). Griffonia simplicifolia I: fluorescent tracer for microcirculatory vessels in nonperfused thin muscles and sectioned muscle. *Microvasc Res* **36**, 199-215.
- Harber M, Trappe S. (2008). Single muscle fiber contractile properties of young competitive distance runners. *J Appl Physiol (1985)* **105**, 629-36.
- Hebbel RP, Miller WJ. (1984). Phagocytosis of sickle erythrocytes: immunologic and oxidative determinants of hemolytic anemia. *Blood* **64**, 733-41.
- Heck H, Mader A, Hess G, Mücke S, Müller R, Hollmann W. (1985). Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. *Int J Sports Med* **6**, 117-30.
- Heck H, Mader A, Hess G, Mücke S, Müller R, Hollmann W. Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. *Int J Sports Med* **6**, 117-30.
- Hedreville M, Charlot K, Waltz X, Sinnapah S, Lemonne N, Etienne-Julan M, Soter V, Hue O, Hardy-Dessources MD, Barthélémy JC, Connes P. (2014). Acute moderate exercise does not further alter the autonomic nervous system activity in patients with sickle cell anemia. *PLoS One* **9**, e95563.
- Henriksson KG. (1979). "Semi-open" muscle biopsy technique. A simple outpatient procedure. *Acta Neurol Scand* **59**, 317-23.
- Hepple RT. (1997). A new measurement of tissue capillarity: the capillary-to-fibre perimeter exchange index. *Can J Appl Physiol* **22**, 11-22.
- Hermansen L, Osnes JB. (1972). Blood and muscle pH after maximal exercise in man. *J Appl Physiol* **32**, 304-308.
- Herrick JB. (1910). Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Intern Med* **6**, 517-521.
- Hodgson M, Docherty D, Robbins D. 2005. Post-activation potentiation: underlying physiology and implications for motor performance. *Sports med* **35**, 585-595.
- Hoedt A, Christensen B, Nellemann B, Mikkelsen UR, Hansen M, Schjerling P, Farup J. (2016). Satellite cell response to erythropoietin treatment and endurance training in healthy young men. *J Physiol* **594**, 727-43.
- Hofrichter J, Ross PD, Eaton WA. (1974). Kinetics and mechanism of deoxyhemoglobin S gelation: a new approach to understanding sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**, 4864-4868.
- Hood MS, Little JP, Tarnopolsky MA, Myslik F, Gibala MJ. (2011). Low-volume interval training improves muscle oxidative capacity in sedentary adults. *Med Sci Sports Exerc* **43**, 1849-1856.
- Hoppeler H, Fluck M. (2003). Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Med Sci Sports Exerc* **35**, 95-104.

- Hoppeler H. (1986). Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *International journal of sports medicine* **7**, 187-204.
- Horton JAB. (1874). *The Diseases of Tropical Climates and Their Treatment*. Churchill.
- Huang S, Czech MP. (2007). The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab* **5**, 237-52.
- Hudlicka O, Brown M, Egginton S. (1992). Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev* **72**, 369-417.
- Hudlická O. (1977). Effect of training on macro- and microcirculatory changes in exercise. *Exerc Sport Sci Rev* **5**, 181-230.
- Hudlicka O. Microcirculation in skeletal muscle. (2011). *Muscles Ligaments Tendons J* **1**, 3-11.
- Ingram VM. (1959). Abnormal human haemoglobins. III. The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobins. *Biochim Biophys Acta* **36**, 402-411.
- Joanisse S, Gillen JB, Bellamy LM, McKay BR, Tarnopolsky MA, Gibala MJ, Parise G. (2013). Evidence for the contribution of muscle stem cells to nonhypertrophic skeletal muscle remodeling in humans. *FASEB J* **27**, 4596-605.
- Johnson FL, Look AT, Gockerman J, Ruggiero MR, Dalla-Pozza L, Billings FT 3rd. (1984). Bone-marrow transplantation in a patient with sickle-cell anemia. *N Engl J Med* **311**, 780-3.
- Jones D, Round J, de Haan A. (2005). *Physiologie du muscle squelettique*, Elsevier.
- Juel C. (2001). Current aspects of lactate exchange: lactate/H<sup>+</sup> transport in human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* **86**, 12-6.
- Juel C. (2006). Training-induced changes in membrane transport proteins of human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* **96**, 627-35.
- Kadi F, Charifi N, Denis C, Lexell J, Andersen JL, Schjerling P, Olsen S, Kjaer M. (2005). The behaviour of satellite cells in response to exercise: what have we learned from human studies? *Pflugers Arch* **451**, 319-327.
- Kadi F. (2000). Adaptation of human skeletal muscle to training and anabolic steroids. *Acta Physiol Scand Suppl* **646**, 1-52.
- Kark JA, Posey DM, Schumacher HR, Ruehle CJ. (1987). Sickle-cell trait as a risk factor for sudden death in physical training. *N Engl J Med* **317**, 781-7.
- 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.
- Kato GJ, Hsieh M, Machado R, Taylor J 6th, Little J, Butman JA, Lehky T, Tisdale J, Gladwin MT. (2006). Cerebrovascular disease associated with sickle cell pulmonary hypertension. *Am J Hematol* **81**, 503-10.
- Kawada S, Ishii N. (2008). Changes in skeletal muscle size, fibre-type composition and capillary supply after chronic venous occlusion in rats. *Acta Physiol (Oxf)* **192**, 541-9.

- Kohli DR, Li Y, Khasabov SG, Gupta P, Kehl LJ, Ericson ME, Nguyen J, Gupta V, Hebbel RP, Simone DA, Gupta K. (2010). Pain-related behaviors and neurochemical alterations in mice expressing sickle hemoglobin: modulation by cannabinoids. *Blood* **116**, 456-65.
- Krishnamurti L, Abel S, Maiers M, Flesch S. (2003). Availability of unrelated donors for hematopoietic stem cell transplantation for hemoglobinopathies. *Bone Marrow Transplant* **31**, 547-50.
- Kusters YH, Barrett EJ. (2016). Muscle microvasculature's structural and functional specializations facilitate muscle metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **310**, E379-87.
- Labie D, Elion J. (2005). Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC-Hématologie* **2**, 220-239.
- Lacolley P, Regnault V, Segers P, Laurent S. (2017). Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening: Relevance in Development, Aging, and Disease. *Physiol Rev* **97**, 1555-1617.
- Lange RD, Minnich V, Moore CV. (1951). Effect of oxygen tension and of pH on the sickling and mechanical fragility of erythrocytes from patients with sickle cell anemia and the sickle cell trait. *J Lab Clin Med* **37**, 789-802.
- Lanzkron S, Haywood C Jr, Hassell KL, Rand C. (2008). Provider barriers to hydroxyurea use in adults with sickle cell disease: a survey of the Sickle Cell Disease Adult Provider Network. *J Natl Med Assoc* **100**, 968-73.
- Lebby R. (1846). Case of absence of the spleen. *South J Med Pharmacol (Charleston)* **1**, 481-483.
- Lewis MI, Fournier M, Wang H, Storer TW, Casaburi R, Kopple JD. (2015). Effect of endurance and/or strength training on muscle fiber size, oxidative capacity, and capillarity in hemodialysis patients. *J Appl Physiol (1985)* **119**, 865-71.
- Lieber RL, Fridén J. (2001). Clinical significance of skeletal muscle architecture. *Clin Orthop Relat Res* 140-51.
- Liem RI, Akinosun M, Muntz DS, Thompson AA. (2017). Feasibility and safety of home exercise training in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer* **64**.
- Lindinger MI, Kowalchuk JM, Heigenhauser GJ. (2005). Applying physicochemical principles to skeletal muscle acid-base status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R891-4.
- Lindinger MI, Leung MJ, Hawke TJ. (2013). Inward flux of lactate(-) through monocarboxylate transporters contributes to regulatory volume increase in mouse muscle fibres. *PLoS One* **8**, e84451.
- Lira VA, Benton CR, Yan Z, Bonen A. (2010). PGC-1alpha regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**, E145-61.
- Ljubicic V, Joseph AM, Saleem A, Ugucioni G, Collu-Marchese M, Lai RY, Nguyen LM, Hood DA. (2010). Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: effects of exercise and aging. *Biochim Biophys Acta* **1800**, 223-34.
- Lonsdorfer J, Bogui P, Le Gallais D, Lonsdorfer A, Sofo I. (1990). Aptitude des drépanocytaires à l'effort physique. *Médecine d'Afrique Noire* **37**, 636-641.

Lowry OH, Passonneau JV. (1972). *A Flexible System of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York.

Mackey AL, Esmarck B, Kadi F, Koskinen SO, Kongsgaard M, Sylvestersen A, Hansen JJ, Larsen G, Kjaer M. (2007). Enhanced satellite cell proliferation with resistance training in elderly men and women. *Scand J Med Sci Sports* **17**, 34-42.

Magdoff-Fairchild B, Poillon WN, Li T, Bertles JF. (1976). Thermodynamic studies of polymerization of deoxygenated sickle cell hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 990-994.

Maier F, Bornemann A. (1999). Comparison of the muscle fiber diameter and satellite cell frequency in human muscle biopsies. *Muscle Nerve* **22**, 578-583.

Mainwood GW, Renaud JM. (1985). The effect of acid-base balance on fatigue of skeletal muscle. *Can J Physiol Pharmacol* **63**, 403-416.

Malekgoudarzi B, Feffer S. (1999). Myonecrosis in sickle cell anemia. *N Engl J Med* **340**, 483.

Maltais F, LeBlanc P, Simard C, Jobin J, Bérubé C, Bruneau J, Carrier L, Belleau R. (1996). Skeletal muscle adaptation to endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **154**, 442-7.

Mani S, Duffy TP. (1993). Sickle myonecrosis revisited. *Am J Med* **95**, 525-30.

Marcinek DJ, Kushmerick MJ, Conley KE. (2010). Lactic acidosis in vivo: testing the link between lactate generation and H<sup>+</sup> accumulation in ischemic mouse muscle. *J Appl Physiol* **108**, 1479-1486.

Martin C, Pialoux V, Faes C, Charrin E, Skinner S, Connes P. (2018). Does physical activity increase or decrease the risk of sickle cell disease complications? *Br J Sports Med* **52**, 214-218.

Mateos-Aierdi AJ, Goicoechea M, Aiastui A, Fernández-Torrón R, Garcia-Puga M, Matheu A, López de Munain A. (2015). Muscle wasting in myotonic dystrophies: a model of premature aging. *Front Aging Neurosci* **7**, 125.

Matsakas A, Patel K. (2009). Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *Histol Histopathol* **24**, 611-29.

Mauro A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* **9**, 493-495.  
May A, Huehns ER. (1975). The concentration dependence of the oxygen affinity of haemoglobin S. *Br J Haematol* **30**, 317-35.

McCullagh KJ, Poole RC, Halestrap AP, O'Brien M, Bonen A. (1996). Role of the lactate transporter (MCT1) in skeletal muscles. *Am J Physiol* **271**, E143-150.

McCurdy PR, Sherman AS. (1978). Irreversibly sickled cells and red cell survival in sickle cell anemia: a study with both DF32P and 51CR. *Am J Med* **64**, 253-258.

Meinild Lundby AK, Jacobs RA, Gehrig S, de Leur J, Hauser M, Bonne TC, Flück D, Dandanell S, Kirk N, Kaech A, Ziegler U, Larsen S, Lundby C. (2018). Exercise training increases skeletal muscle mitochondrial volume density by enlargement of existing mitochondria and not de novo biogenesis. *Acta Physiol (Oxf)* **222**.

- Mentzer WC, Heller S, Pearle PR, Hackney E, Vichinsky E. (1994). Availability of related donors for bone marrow transplantation in sickle cell anemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* **16**, 27-9.
- Merlet AN, Chatel B, Hourdé C, Ravelojaona M, Bendahan D, Féasson L, Messonnier LA. (2018). How Sickle Cell Disease Impairs Skeletal Muscle Function: Implications in Daily Life. *Med Sci Sports Exerc*.
- Messonnier L, Freund H, Bourdin M, Belli A, Lacour JR. (1997). Lactate exchange and removal abilities in rowing performance. *Med Sci Sports Exerc* **29**, 396-401.
- Messonnier L, Freund H, Féasson L, Prieur F, Castells J, Denis C, Linossier MT, Geysant A, Lacour JR. (2001). Blood lactate exchange and removal abilities after relative high-intensity exercise: effects of training in normoxia and hypoxia. *Eur J Appl Physiol* **84**, 403-12.
- Messonnier L, Kristensen M, Juel C, Denis C. (2007). Importance of pH regulation and lactate/H<sup>+</sup> transport capacity for work production during supramaximal exercise in humans. *J Appl Physiol (1985)* **102**, 1936-44.
- Messonnier LA, Dubouchaud H. (2010). « Le lactate : sa cinétique, son métabolisme, ses relations avec la performance et ses controverses ». *Movement & Sport Sciences* **70**, 21-30.
- Messonnier LA, Emhoff CA, Fattor JA, Horning MA, Carlson TJ, Brooks GA. (2013). Lactate kinetics at the lactate threshold in trained and untrained men. *J Appl Physiol (1985)* **114**, 1593-602.
- Metcalfe B, Chuang C, Dufu K, Patel MP, Silva-Garcia A, Johnson C, Lu Q, Partridge JR, Patskovska L, Patskovsky Y, Almo SC, Jacobson MP, Hua L, Xu Q, Gwaltney SL 2nd, Yee C, Harris J, Morgan BP, James J, Xu D, Hutchaleelaha A, Paulvannan K, Oksenberg D, Li Z. (2017). Discovery of GBT440, an Orally Bioavailable R-State Stabilizer of Sickle Cell Hemoglobin. *ACS Med Chem Lett* **8**, 321-326.
- Meunier B, Picard B, Astruc T, Labas R. (2010). Development of image analysis tool for the classification of muscle fibre type using immunohistochemical staining. *Histochem Cell Biol* **134**, 307-17.
- Miller BF, Fattor JA, Jacobs KA, Horning MA, Navazio F, Lindinger MI, Brooks GA. (2002). Lactate and glucose interactions during rest and exercise in men: effect of exogenous lactate infusion. *J Physiol* **544**, 963-75.
- Millis RM, Baker FW, Ertugrul L, Douglas RM, Sexcius L. (1994). Physical performance decrements in children with sickle cell anemia. *JAMA* **86**, 113-6.
- Min-Oo G, Gros P. (2005). Erythrocyte variants and the nature of their malaria protective effect. *Cell Microbiol* **7**, 753-63.
- Moheeb H, Wali YA, El-Sayed MS. (2007). Physical fitness indices and anthropometrics profiles in schoolchildren with sickle cell trait/disease. *Am J Hematol* **82**, 91-7.
- Moheeb H, Wali YA, El-Sayed MS. (2007). Physical fitness indices and anthropometrics profiles in schoolchildren with sickle cell trait/disease. *Am J Hematol* **82**, 91-7.
- Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, Hazen SL, Vichinsky EP, Morris SM Jr, Gladwin MT. (2005). Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA* **294**, 81-90.

Moss FP, Leblond CP. (1971). Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat Rec* **170**, 421-435.

Mounier R, Chrétien F, Chazaud B. (2011). Blood vessels and the satellite cell niche. *Curr Top Dev Biol* **96**, 121-38.

Murach KA, Fry CS, Kirby TJ, Jackson JR, Lee JD, White SH, Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ, Peterson CA. (2018). Starring or Supporting Role? Satellite Cells and Skeletal Muscle Fiber Size Regulation. *Physiology (Bethesda)* **33**, 26-38.

Nahavandi M, Tavakkoli F, Hasan SP, Wyche MQ, Castro O. (2004). Cerebral oximetry in patients with sickle cell disease. *Eur J Clin Invest* **34**, 143-8.

Nederveen JP, Joannis S, Snijders T, Thomas ACQ, Kumbhare D, Parise G. (2018). The influence of capillarization on satellite cell pool expansion and activation following exercise-induced muscle damage in healthy young men. *J Physiol* **596**, 1063-1078.

Neel J. (1949). The inheritance of sickle cell anemia. *Science* **110**, 64-66.

Noor SI, Pouyssegur J, Deitmer JW, Becker HM. Integration of a 'proton antenna' facilitates transport activity of the monocarboxylate transporter MCT4. *The FEBS journal* **284**, 149-162.

Ohara DG, Ruas G, Walsh IA, Castro SS, Jamami M. (2014). Lung function and six-minute walk test performance in individuals with sickle cell disease. *Braz J Phys Ther* **18**, 79-87.

Oksenberg D, Dufu K, Patel MP, Chuang C, Li Z, Xu Q, Silva-Garcia A, Zhou C, Hutchaleelaha A, Patskovska L, Patskovsky Y, Almo SC, Sinha U, Metcalf BW, Archer DR. (2016). GBT440 increases haemoglobin oxygen affinity, reduces sickling and prolongs RBC half-life in a murine model of sickle cell disease. *Br J Haematol* **175**, 141-53.

Olfert IM, Baum O, Hellsten Y, Egginton S. (2016). Advances and challenges in skeletal muscle angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **310**, H326-36.

Olfert IM, Breen EC, Mathieu-Costello O, Wagner PD. (2001). Skeletal muscle capillarity and angiogenic mRNA levels after exercise training in normoxia and chronic hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* **91**, 1176-84.

Orngreen MC, Olsen DB, Vissing J. (2005). Aerobic training in patients with myotonic dystrophy type 1. *Ann Neurol* **57**, 754-757.

Orringer EP, Casella JF, Ataga KI, Koshy M, Adams-Graves P, Luchtman-Jones L, Wun T, Watanabe M, Shafer F, Kutlar A, Abboud M, Steinberg M, Adler B, Swerdlow P, Terregino C, Saccante S, Files B, Ballas S, Brown R, Wojtowicz-Praga S, Grindel JM. (2001). Purified poloxamer 188 for treatment of acute vaso-occlusive crisis of sickle cell disease: A randomized controlled trial. *JAMA* **286**, 2099-106.

Osarogiagbon UR, Choong S, Belcher JD, Vercellotti GM, Paller MS, Hebbel RP. (2000). Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. *Blood* **96**, 314-20.

Osnes JB, Hermansen L. (1972). Acid-base balance after maximal exercise of short duration. *J Appl Physiol* **32**, 59-63.

P Telfer, J Lehrer-Graiwer, M Tonda, E Ramos. (2016). GBT440, a Novel Sickle Haemoglobin Polymerisation Inhibitor, Increases Haemoglobin Oxygen Affinity and Results in a Rapid Improvement in Haemolysis and Anaemia *European Medical Journal* **4**, 63-64.

- Pathare N, Vandeborne K, Liu M, Stevens JE, Li Y, Frimel TN, Walter GA. (2008). Alterations in inorganic phosphate in mouse hindlimb muscles during limb disuse. *NMR Biomed* **21**, 101-10.
- Patterson MF, Stephenson GM, Stephenson DG. 2006. Denervation produces different single fiber phenotypes in fast- and slow-twitch hindlimb muscles of the rat. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**, C518-528.
- Pauling L, Itano H, Singer SG, Wells IC. (1949). Sickle cell anemia a molecular disease. *Science* **110**, 543-548.
- Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME, Payen E, Tighe R, Bouhassira EE, Acharya SA, Ellis J, London IM, Eaves CJ, Humphries RK, Beuzard Y, Nagel RL, Lebourch P. (2001). Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science* **294**, 2368-71.
- Pegelow CH, Colangelo L, Steinberg M, Wright EC, Smith J, Phillips G, Vichinsky E. (1997). Natural history of blood pressure in sickle cell disease: risks for stroke and death associated with relative hypertension in sickle cell anemia. *Am J Med* **102**, 171-7.
- Phillips SM. (2014). A brief review of critical processes in exercise-induced muscular hypertrophy. *Sports medicine* **44**, S71-77.
- Pianos P, D'Souza SJ, Charge TD, Béland MJ, Esseltine DW, Coates AL. (1991). Cardiac output and oxygen delivery during exercise in sickle cell anemia. *Am Rev Respir Dis* **143**, 231-5.
- Pianos P, D'Souza SJ, Esseltine DW, Charge TD, Coates AL. (1991). Ventilation and gas exchange during exercise in sickle cell anemia. *Am R Respir Dis* **143**, 226-230.
- Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Williams TN, Weatherall DJ, Hay SI. (2010). Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun* **2**, 1:104.
- Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. (2017). Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* **376**, 1561-1573.
- Pilegaard H, Terzis G, Halestrap A, Juel C. (1999). Distribution of the lactate/H<sup>+</sup> transporter isoforms MCT1 and MCT4 in human skeletal muscle. *Am J Physiol* **276**, E843-848.
- Poulsen JB. (2012). Impaired physical function, loss of muscle mass and assessment of biomechanical properties in critical ill patients. *Danish medical journal* **59**, B4544.
- Powers SK, Jackson MJ. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* **88**, 1243-76.
- Quinn CT, Sargent JW. (2008). Daytime steady-state haemoglobin desaturation is a risk factor for overt stroke in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* **140**, 336-9.
- Ravelojaona M, Féasson L, Oyono-Enguélé S, Vincent L, Djoubairou B, Ewa'Sama Essoue C, Messonnier LA. (2015). Evidence for a profound remodeling of skeletal muscle and its microvasculature in sickle cell anemia. *Am J Pathol* **185**, 1448-56.
- Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. (2010). Sickle-cell disease. *Lancet* **376**, 2018-31.



- Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO 3rd, Schechter AN, Gladwin MT. (2002). Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* **8**, 1383-1389.
- Relaix F, Marcelle C. (2009). Muscle stem cells. *Current opinion in cell biology* **21**, 748-753.
- Repka T, Hebbel RP. (1991). Hydroxyl radical formation by sickle erythrocyte membranes: role of pathologic iron deposits and cytoplasmic reducing agents. *Blood* **78**, 2753-8.
- Reznik M. (1969). Origin of myoblasts during skeletal muscle regeneration. Electron microscopic observations. *Lab Invest* **20**, 353-63.
- Ribeil JA, Hacein-Bey-Abina S, Payen E, Magnani A, Semeraro M, Magrin E, Caccavelli L, Neven B, Bourget P, El Nemer W, Bartolucci P, Weber L, Puy H, Meritet JF, Grevent D, Beuzard Y, Chrétien S, Lefebvre T, Ross RW, Negre O, Veres G, Sandler L, Soni S, de Montalembert M, Blanche S, Leboulch P, Cavazzana M. (2017). Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* **376**, 848-855.
- Robergs RA, Ghasvand F, Parker D. (2004). Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R502-516.
- Robergs RA, Ghasvand F, Parker D. (2005). Lingering construct of lactic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.
- Ross A, Leveritt M. (2001). Long-term metabolic and skeletal muscle adaptations to short-sprint training: implications for sprint training and tapering. *Sports Med* **31**, 1063-82.
- Sahlin K, Harris RC, Ny Lind B, Hultman E. (1976). Lactate content and pH in muscle obtained after dynamic exercise. *Pflugers Arch* **367**, 143-149.
- Sandow A. (1965). Excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Pharmacol Rev* **17**, 265-320.
- Schmalbruch H. (1976). [Skeletal muscle regeneration]. *Verh Anat Ges* 691-701.
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* **102**, 777-86.
- Setty BN, Stuart MJ, Dampier C, Brodecki D, Allen JL. (2003). Hypoxaemia in sickle cell disease: biomarker modulation and relevance to pathophysiology. *Lancet* **362**, 1450-5.
- Shemin D, Rittenberg D. (1946). The life span of the human red blood cell. *J Biol Chem* **166**, 627-636.
- Sies H, Cadenas E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **311**, 617-31.
- Sillen MJ, Franssen FM, Gosker HR, Wouters EF, Spruit MA. (2013). Metabolic and structural changes in lower-limb skeletal muscle following neuromuscular electrical stimulation: a systematic review. *PLoS One* **8**, e69391.
- Singh SA, Koumbourlis AC, Aygun B. (2008). Resolution of chronic hypoxemia in pediatric sickle cell patients after treatment with hydroxyurea. *Pediatr Blood Cancer* **50**, 1258-60.

- Snijders T, Nederveen JP, McKay BR, Joannisse S, Verdijk LB, van Loon LJ, Parise G. (2015). Satellite cells in human skeletal muscle plasticity. *Front Physiol* **6**, 283.
- Spriet, LL, Watt MJ. (2003). Regulatory mechanisms in the interaction between carbohydrate and lipid oxidation during exercise. *Acta Physiol. Scand.* **178**, 443–452.
- Staron RS, Malicky ES, Leonardi MJ, Falkel JE, Hagerman FC, Dudley GA. (1990). Muscle hypertrophy and fast fiber type conversions in heavy resistance-trained women. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **60**, 71-9.
- Steinberg MH, Barton F, Castro O, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A, Orringer E, Bellevue R, Olivieri N, Eckman J, Varma M, Ramirez G, Adler B, Smith W, Carlos T, Ataga K, DeCastro L, Bigelow C, Sauntharajah Y, Telfer M, Vichinsky E, Claster S, Shurin S, Bridges K, Waclawiw M, Bonds D, Terrin M. (2003). Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA* **289**, 1645-51.
- Steinberg MH, Embury SH. (1986). Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. *Blood* **68**, 985-990.
- Steinberg MH. (1999). Management of sickle cell disease. *N Engl J Med* **340**, 1021-30.
- Stridh MH, Alt MD, Wittmann S, Heidtmann H, Aggarwal M, Riederer B, Seidler U, Wennemuth G, McKenna R, Deitmer JW, Becker HM. (2012). Lactate flux in astrocytes is enhanced by a non-catalytic action of carbonic anhydrase II. *J Physiol* **590**, 2333-51.
- Sundberg CW, Hunter SK, Trappe SW, Smith CS, Fitts RH. (2018). Effects of elevated H<sup>+</sup> and P<sub>i</sub> on the contractile mechanics of skeletal muscle fibres from young and old men: implications for muscle fatigue in humans. *J Physiol*.
- Sveen ML, Jeppesen TD, Hauerslev S, Køber L, Krag TO, Vissing J. (2008). Endurance training improves fitness and strength in patients with Becker muscular dystrophy. *Brain* **131**, 2824-31.
- Sveen ML, Jeppesen TD, Hauerslev S, Krag TO, Vissing J. (2007). Endurance training: an effective and safe treatment for patients with LGMD2I. *Neurology* **68**, 59-61.
- Telfer P, Agodoa I, Fox KM, Burke L, Mant T, Jurek M, Tonda M, Lehrer-Graiwer J. (2018). Impact of voxelotor (GBT440) on unconjugated bilirubin and jaundice in sickle cell disease. *Hematol Rep* **10**, 7643.
- Tripette J, Connes P, Hedreville M, Etienne-Julan M, Marlin L, Hue O, Hardy-Dessources MD. (2010). Patterns of exercise-related inflammatory response in sickle cell trait carriers. *Br J Sports Med* **44**, 232-7.
- Tsaras G, Owusu-Ansah A, Boateng FO, Amoateng-Adjepong Y. (2009). Complications associated with sickle cell trait: a brief narrative review. *Am J Med* **122**, 507-12.
- Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Coller BS, Frenette PS. (2002). Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3047-51.
- Ueda Y, Bookchin RM. (1984). Effects of carbon dioxide and pH variations in vitro on blood respiratory functions, red blood cell volume, transmembrane pH gradients, and sickling in sickle cell anemia. *J Lab Clin Med* **104**, 146-159.

- Ueda Y, Bookchin RM. (1984). Effects of carbon dioxide and pH variations in vitro on blood respiratory functions, red blood cell volume, transmembrane Ph gradients, and sickling in sickle cell anemia. *J Lab Clin Med* **104**, 146-159.
- Vallier JM, Chateau P, Guezennec CY. (1996). Effects of physical training in a hypobaric chamber on the physical performance of competitive triathletes. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **73**, 471-8.
- Vekilov PG. (2007). Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? *Br J Haematol* **139**, 173-184.
- Verney J, Kadi F, Charifi N, Féasson L, Saafi MA, Castells J, Piehl-Aulin K, Denis C. (2008). Effects of combined lower body endurance and upper body resistance training on the satellite cell pool in elderly subjects. *Muscle Nerve* **38**, 1147-54.
- Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, Nickerson B, Orringer E, McKie V, Bellevue R, Daeschner C, Mancini EA. (2000). Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. *N Engl J Med* **342**, 1855-65.
- Vincent L, Féasson L, Oyono-Enguélé S, Banimbek V, Denis C, Guarneri C, Aufradet E, Monchanin G, Martin C, Gozal D, Dohbobga M, Wouassi D, Garet M, Thiriet P, Messonnier L. (2010). Remodeling of skeletal muscle microvasculature in sickle cell trait and alpha-thalassemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H375-84.
- Vincent L, Oyono-Enguélé S, Féasson L, Banimbek V, Dohbobga M, Martin C, Thiriet P, Francina A, Dubouchaud H, Sanchez H, Chapot R, Denis C, Geysant A, Messonnier L. (2012). Effects of regular physical activity on skeletal muscle structural, energetic, and microvascular properties in carriers of sickle cell trait. *J Appl Physiol (1985)* **113**, 549-56.
- Voskaridou E, Christoulas D, Bilalis A, Plata E, Varvagiannis K, Stamatopoulos G, Sinopoulou K, Balassopoulou A, Loukopoulos D, Terpos E. (2010). The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle cell syndromes: results of a 17-year, single-center trial (LaSHS). *Blood* **115**, 2354-63.
- Waltz X, Hedreville M, Sinnapah S, Lamarre Y, Soter V, Lemonne N, Etienne-Julan M, Beltan E, Chalabi T, Chout R, Hue O, Mougengel D, Hardy-Dessources MD, Connes P. (2012a). Delayed beneficial effect of acute exercise on red blood cell aggregate strength in patients with sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc* **52**, 15-26.
- Waltz X, Pichon A, Lemonne N, Mougengel D, Lalanne-Mistrih ML, Lamarre Y, Tarer V, Tressières B, Etienne-Julan M, Hardy-Dessources MD, Hue O, Connes P. (2012b). Normal muscle oxygen consumption and fatigability in sickle cell patients despite reduced microvascular oxygenation and hemorheological abnormalities. *PLoS One* **7**, e52471.
- Ware RE, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR. (2017). Sickle cell disease. *Lancet* **390**, 311-323.
- Watkins SC, Cullen MJ. (1988). A quantitative study of myonuclear and satellite cell nuclear size in Duchenne's muscular dystrophy, polymyositis and normal human skeletal muscle. *Anat Rec* **222**, 6-11.
- Weiner DL, Hibberd PL, Betit P, Cooper AB, Botelho CA, Brugnara C. (2003). Preliminary assessment of inhaled nitric oxide for acute vaso-occlusive crisis in pediatric patients with sickle cell disease. *JAMA* **289**, 1136-42.

- White FC, Bloor CM, McKirnan MD, Carroll SM. (1998). Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart. *J Appl Physiol* (1985) **85**, 1160-8.
- Widmaier EP, Raff H, Strang KT. (2008). *Human Physiology - The mechanisms of body function*. New York, McGraw-Hill Science. Eleventh edition.
- Williams TN. (2006). Human red blood cell polymorphisms and malaria. *Curr Opin Microbiol* **9**, 388-94.
- Wilmore JH, David LC, Larry WK. (2008). *Physiology of sport and exercise, 4<sup>th</sup> edition*. Human Kinetics.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**, 242-8.
- Yoshida Y, Hatta H, Kato M, Enoki T, Kato H, Bonen A. (2004). Relationship between skeletal muscle MCT1 and accumulated exercise during voluntary wheel running. *J Appl Physiol* **97**, 527-534.
- Young RC Jr, Rachal RE, Del Pilar Aguinaga M, Nelson BL, Kim BC, Winter WP, Castro O. (2000). Automated oxyhemoglobin dissociation curve construction to assess sickle cell anemia therapy. *J Natl Med Assoc* **92**, 430-435.
- Ziada AM, Hudlicka O, Tyler KR, Wright AJ. (1984). The effect of long-term vasodilatation on capillary growth and performance in rabbit heart and skeletal muscle. *Cardiovasc Res* **18**, 724-732.
- Zimmerman SA, Schultz WH, Burgett S, Mortier NA, Ware RE. (2007). Hydroxyurea therapy lowers transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anemia. *Blood* **110**, 1043-7.

# ANNEXES

# 1. Publications, communications, prix et bourses

---

## Publications dans des revues scientifiques internationales

---

**Merlet AN\***, Chatel B\*, Hourdé C, Ravelojaona M, Bendahan D, Féasson L, Messonnier LA. How Sickle Cell Disease Impairs Skeletal Muscle Function: Implications in Daily Life. **Med Sci Sports Exerc.** 2018.

Gellen B\*, Messonnier LA\*, Galactéros F, Audureau E, **Merlet AN**, Rupp T, Peyrot S, Martin C, Féasson L\*, Bartolucci P\*. Moderate-intensity endurance-exercise training in sickle cell disease patients without severe chronic complications: an open-label randomized controlled trial. **The Lancet Haematology.** 2018.

**Merlet AN**, Messonnier L, Gellen B, Bartolucci P, Féasson L. Beneficial effects of a moderate-intensity endurance-exercise training on skeletal muscle microvasculature in sickle cell disease patients. *Haematologica. (en révision)*

**Merlet AN**, Messonnier L, Bartolucci P, Hourde C, Gellen B, Deldicque L, Francaux M, Féasson L. Muscle structural and energetic benefits of endurance exercise training in sickle cell disease patients. *(prochainement soumis)*

Januel L, **Merlet AN**, He Z, Gellen B, Bartolucci P, Messonnier LA, Féasson L. Could moderate-intensity endurance-exercise modulate the muscle regeneration potential in sickle cell disease patients? *En cours d'écriture*

---

## Communications dans des congrès internationaux

---

**Merlet A**, Messonnier L, Bartolucci P, Hourde C, Lacroix R, Gellen B, Peyrot S, Rupp T, Galacteros F, Féasson L. (2018). Beneficial effects of endurance training on skeletal muscle microvasculature in patients with sickle cell disease. **European College of Sport Science.** Juillet, Dublin, Irlande *(présentation orale)*.

**Merlet A**, Messonnier L, Bartolucci P, Hourde C, Lacroix R, Gellen B, Peyrot S, Rupp T, Galacteros F, Féasson L. (2018). Beneficial effects of endurance training on skeletal muscle microvasculature in patients with sickle cell disease. **13ème congrès international sur la drépanocytose.** Mai, Strasbourg, France *(présentation orale)*.

**Merlet A**, Messonnier L, Bartolucci P, Gellen B, Hourde C, Fraucaux M, Deldicque L, Peyrot S, Rupp T, Galacteros F, Féasson L. (2017). Evaluation d'un programme d'entraînement pour des patients drépanocytaires homozygotes : bénéfiques sur l'aptitude physique et le tissu musculaire squelettique. **Congrès International de l'Association des Chercheurs en Activité Physique et Sportive.** Octobre, Dijon, France *(présentation orale)*.

---

## Communications dans des congrès nationaux

---

**Merlet A**, Messonnier L, Bartolucci P, Gellen B, Hourde C, Fraucaux M, Deldicque L, Peyrot S, Rupp T, Galacteros F, Féasson, L. (2018). L'exercice physique chez le patient drépanocytaire : plus redouté que redoutable ! **Journée de la recherche de l'école doctorale.** Juin, Saint-Etienne, France *(poster)*.

**Merlet A**, Messonnier L, Hourde C, Bartolucci P, Gellen B, Deldicque L, Francaux M, Féasson L. (2018) Muscle structural and energetic benefits of 8 weeks of moderate endurance training

in sickle cell disease patients. **Exercise, locomotion and musculoskeletal system.** Mai, Lyon, France (*poster*).

**Merlet A**, Messonnier L, Bartolucci P, Gellen B, Hourde C, Fraucaux M, Deldicque L, Peyrot S, Rupp T, Galacteros F, Féasson, L. (2017). L'activité physique adaptée pour le muscle du patient drépanocytaire ? Même très peu, c'est déjà très bien. **Journées de la Société Française de Myologie.** Novembre, Colmar, France (*poster*).

**Merlet A**, Messonnier L, Bartolucci P, Lacroix R, Gellen B, Peyrot S, Rupp T, Galacteros F, Féasson, L. (2016). Endurance training program to improve physical fitness and skeletal muscle characteristics in sickle cell anemia. **Journées de la Société Française de Myologie.** Novembre, Bordeaux, France (*présentation orale*).

**Merlet A**, Messonnier L, Bartolucci P, Lacroix R, Gellen B, Peyrot S, Rupp T, Galacteros F, Féasson L. (2016). Evaluation d'un programme d'entraînement pour des patients drépanocytaires homozygotes : bénéfiques sur l'aptitude physique et le tissu musculaire squelettique. **Académie Nationale de Médecine.** Mai, Saint-Etienne, France (*poster*).

---

### Communication de vulgarisation scientifique

---

**Merlet A.** (2017). Le sport : le meilleur ennemi du drépanocytaire. **Ma thèse en 180 secondes**, finale nationale belge. Mars et Mai, Louvain-la-Neuve, Belgique.

---

### Récompenses et bourse

---

**Lauréate** pour les meilleures communications orales. **Journée de la recherche doctorale.** Juin 2018, St-Etienne, France. (100€)

**Lauréate** pour les meilleures communications orales. **Journée Exercise, locomotion and musculoskeletal system.** Mai 2018, Lyon, France. (200€)

**Lauréate** pour le concours **Ma Thèse en 180 secondes.** Participation à la finale nationale belge. Mars et mai 2017, Louvain-la-Neuve, Belgique. (120€)

Obtention d'une **bourse de mobilité sortante** de l'Université de Lyon : PALSE (Programme Avenir Lyon-St-Etienne). (3750€)

---

### Publications et communication hors projet de thèse

---

**Merlet AN\***, Cattagni T\*, Cornu C, Jubeau M. Effect of knee angle on neuromuscular assessment of plantar flexor muscles: A reliability study. **PLoS ONE** 2018; 13(3): e0195220. doi.org/10.1371/journal.pone.0195220.

Cattagni T, **Merlet AN**, Cornu C, Jubeau M. H-reflex and M-wave recordings: effect of pressure application to the stimulation electrode on the assessment of evoked potentials and subject's discomfort. **Clin Physiol Funct Imaging.** 2018; 38(3): 416-424. doi: 10.1111/cpf.12431.

**Merlet A**, Cattagni T, Cornu C, Jubeau M. (2015). Reproductibilité intra- et intersession des mesures neuromusculaires des fléchisseurs plantaires selon l'angle du genou. **Journées de la Société Française de Myologie.** Novembre, Lyon, France (*poster*).

## 2. Fiches méthodologiques

**Fiche méthodologique 1** : Immunofluorescence : BA-D5 et N2

**Fiche méthodologique 2** : Immunohistologie peroxydase : CD31

**Fiche méthodologique 3** : Histoenzymologie : activité de la cytochrome c oxidase

**Fiche méthodologique 4** : Histoenzymologie : activités de la cytochrome c oxidase/succinate déshydrogénase

**Fiche méthodologique 5** : Immunofluorescence : CD56 et Ki67

**Fiche méthodologique 6** : Protocole d'extraction pour dosage enzymatique

**Fiche méthodologique 7** : Spectrophotométrie : myokinase et créatine kinase

**Fiche méthodologique 8** : Spectrophotométrie : émolase

**Fiche méthodologique 8** : Spectrophotométrie : lactate déshydrogénase

**Fiche méthodologique 9** : Spectrophotométrie : citrate synthase

**Fiche méthodologique 10** : Spectrophotométrie :  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Déshydrogénase

**Fiche méthodologique 11** : Spectrophotométrie : complexe II de la chaîne respiratoire

**Fiche méthodologique 12** : Spectrophotométrie : complexe IV de la chaîne respiratoire

**Fiche méthodologique 13** : Protocole d'extraction pour western blot

**Fiche méthodologique 14** : Western blot



---

## IMMUNOFLUORESCENCE : BA-D5 et N2

---

### Réactifs

Ac Myosin BA-D5 (DSHB)

Ac Myosin N2

BSA

Anti Laminine (Sigma L9393)

Alexa fluor 488 Goat anti Mouse (Invitrogen A 11001)

Alexa fluor 546 Goat anti Rabbit (Invitrogen A 11010)

PBS

### Procédure expérimentale

1. Faire sécher les lames 1h
2. Délimiter avec le stylo hydrophobe « Dakopen » le contour des coupes
3. Saturer au BSA 10% pendant 15 minutes à température ambiante
4. Hybridation avec l'anticorps primaire pendant 1 heure à 37°C en atmosphère humide

Pour 20 lames, 2000 µL (10 lames N2 + 10 lames BAD5)

	Tube BA-D5	Tube N2
<b>Anticorps BAD5 (2/3)</b>	667 µL	-
<b>Anticorps N2 (1/50)</b>	-	20 µL
<b>BSA 10%</b>	100 µL	100 µL
<b>Laminine (10<sup>ème</sup>) 1/100</b>	100 µL	100 µL
<b>PBS</b>	134 µL	780 µL

5. Rinçage rapide dans PBS
6. Rincer 10 minutes dans PBS
7. Hybridation anticorps secondaires pendant 1 heure à 37°C en atmosphère humide

Pour 20 lames (2000µL)

<b>Secondaire rabbit (488) (1/400)</b>	5 µL
<b>Secondaire mouse (546) (1/400)</b>	5µL
<b>BSA 10%</b>	200 µL
<b>PBS</b>	1790 µL

8. Rinçage rapide dans PBS
9. Rincer 10 minutes dans PBS
10. Déposer sur chaque lame environ 30 µL de milieu de montage aqueux (fluoromount), mettre une lamelle et exercer une faible pression afin de chasser les bulles d'air.
11. Laisser sécher les lames au réfrigérateur et les conserver à +4°C dans l'obscurité.

---

## IMMUNOHISTOLOGIE PEROXYDASE : CD31

---

### Réactifs

Dako P 260 (Lapin anti-souris)  
Dako P 217 (Porc anti-lapin)  
CD31

### Procédure expérimentale

#### *Préparation du tampon Tris*

Tris 0,5 M  
Ajuster à 1L de solution avec H<sub>2</sub>O

Trizma base  
NaCl (Recaptur)  
HCl (N)

#### *Préparation du TSAB*

**TSAB (Tris – Sérum Albumine Bovine) :** Préparation de 100 mL  
5 mL SAB/100 mL Tris 0,05 M

1. Faire sécher les lames 1 heure
2. Délimiter avec le stylo hydrophobe « Dakopen » le contour des coupes
3. Réhydratation dans Tris 0,05 M pendant 5 min puis dans le TSAB pendant 1 min
4. Hybridation avec l'anticorps primaire pendant 2 heures à température ambiante (CD31 dilution au 1/20 dans le TSAB)
5. Rinçage dans le Tris 0,05 M pendant 2 x 5 min
6. Passage dans le TSAB pendant 5 min
7. Hybridation avec l'anticorps secondaire pendant 1 heure à température ambiante (Dako P 260 dilution au 1/20 dans le TSAB)
8. Rinçage dans le Tris 0,05 M pendant 2 x 5 min
9. Passage dans le TSAB pendant 5 min
10. Hybridation avec l'anticorps tertiaire pendant 1 heure à température ambiante (Dako P 217 dilution au 1/20 dans le TSAB)
11. Rinçage dans le Tris 0,05 M pendant 2 x 5 min
12. Passage dans le TSAB pendant 5 min

#### *Préparation du chromogène*

1 goutte de chromogène pour 1 mL de DAB

13. Incubation du chromogène à température ambiante pendant 1 min 30
14. Rinçage 3 x 5 min à l'H<sub>2</sub>O

#### *Montage des lames*

Déshydratation dans les 3 bains d'alcool : 95° ; 100° ; 100°  
Xylène  
Montage à l'Eukitt

---

## HISTOENZYMOLOGIE : ACTIVITE DE LA CYTOCHROME C OXIDASE

---

### Réactifs

Phosphate de sodium disodique (réf : S-0876 / Sigma)  
Phosphate de sodium monosodique (réf : S-0751 / Sigma)  
3-3 Diaminobenzidine grade III (réf : D-5637 / Sigma)  
Cytochrome c type III (réf : C-2506 / Sigma)  
Catalase (réf : C-100 / Sigma)  
Saccharose / Sucrose (réf : 477187 / Carlo Erba)

### Procédure expérimentale

#### ***Préparation du tampon phosphate 0,05 M pH 7,3***

Phosphate de sodium disodique 1,281 g  
Phosphate de sodium monosodique 0,386 g  
H<sub>2</sub>O distillée 100 mL

#### ***Préparation de la solution de Diaminobenzidine***

Peser 10 mg de Diaminobenzidine  
Ajouter 18 mL de tampon phosphate 0,05 M  
Filtrer  
Mettre 5 µL de catalase dans 250 mL d'H<sub>2</sub>O  
Couvrir et agiter pendant 10 min

#### ***Milieu réactionnel de la coloration COx***

Cytochrome c 20 mg  
Saccharose 1,5 g  
Solution de catalase 2 mL  
Solution de Diaminobenzidine 18 mL  
Mettre les lames à incuber dans cette solution 2h à température ambiante  
Rincer à l'H<sub>2</sub>O distillée pendant 15'

#### ***Montage des lames***

Déshydratation dans les 3 bains d'alcool : 95° ; 100° ; 100°  
Xylène  
Montage à l'Eukitt

---

## HISTOENZYMOLOGIE : ACTIVITE DE LA CYTOCHROME C OXIDASE/SUCCINATE DESHYDROGENASE

---

### Réactifs

Phosphate de sodium disodique (réf : S-0876 / Sigma)  
Phosphate de sodium monosodique (réf : S-0751 / Sigma)  
Sodium succinate  
NBT

### Procédure expérimentale

#### ***Préparation du tampon phosphate 0,2 M***

Phosphate disodique 0,1 M :

Peser 1,42g du phosphate disodique  
Dissoudre dans 100ml d'H<sub>2</sub>O

Phosphate monosodique, monohydraté 0,1 M :

Peser 1,2g de phosphate monosodique  
Dissoudre dans 100ml d'H<sub>2</sub>O

Prendre 10 ml du tampon phosphate monosodique  
Ajuster le pH à 7,2 avec le phosphate disodique (~20ml)

#### ***Préparation de la solution de sodium succinate 0,2 M***

Peser 1,18g du sodium succinate 0,2M  
Dissoudre dans 50ml d'H<sub>2</sub>O

#### ***Préparation du milieu réactionnel de la coloration SDH***

Pipeter 10 ml du tampon phosphate 0,2 M  
Ajouter 10 ml du sodium succinate  
Ajuster le pH à 7,0  
Peser 20mg du NBT  
Ajouter 20 ml d'H<sub>2</sub>O

Les lames sont d'abord incubées 2 heures dans le milieu réactionnel de la coloration COx (fiche méthodologique 3) puis rincées à l'H<sub>2</sub>O puis incubées 2 heures dans le milieu réactionnel de la coloration SDH.

#### ***Rinçage et montage***

Rincer à l'eau distillée  
Coller une lamelle sur la lame à l'aide du milieu de montage Aquatex

---

## IMMUNOFLUORESCENCE : CD56 et Ki67

---

### Réactifs

Ac CD56

Ac Ki67

Anti Laminine (Sigma L9393)

Serum humain

Alexa fluor 488 Goat anti Mouse (Invitrogen A 11001)

Alexa fluor 488 Goat anti Rabbit (Invitrogen A 11001)

Alexa fluor 546 Goat anti Mouse (Invitrogen A 11010)

Alexa fluor 546 Goat anti Rabbit (Invitrogen A 11010)

PBS

Triton

Formaldéhyde

### Procédure expérimentale

1. Faire sécher les lames 1h
2. Délimiter avec le stylo hydrophobe « Dakopen » le contour des coupes
3. Fixer dans du Formaldéhyde à 4% pendant 10 min
4. Laver dans du PBS - 2 rinçages rapides
5. Saturer au sérum humain 10% pendant 1h
6. Laver les lames dans du PBS - 1 rinçage rapide puis rincer 10min
7. Appliquer les anticorps primaires - laisser 2h à température ambiante

### Lame CD56-Laminin :

Laminin : 1/200

CD56 : 1/50

Sérum humain : 1/10

PBS

### Lame CD56-Ki67 :

Ki-67 : 1/500

CD56 : 1/50

Sérum humain : 1/10

Triton : 0,2%

PBS

8. Laver les lames dans du PBS - 1 rinçage rapide puis rincer 10min
9. Appliquer les anticorps secondaires - laisser 1h dans le noir à température ambiante

### Lame CD56-Laminin :

Alexa-Fluor 568 : 1/400

Alexa-Fluor 488 : 1/400

Sérum Humain : 1/10

PBS

10. Laver les lames dans du PBS - 1 rinçage rapide puis rincer 10min
11. Monter les lames avec un milieu de montage DAPI

---

## PROCOLE D'EXTRACTION POUR DOSAGE ENZYMATIQUE

---

L'extraction protéique nécessite la préparation de tampon mannitol.

### Protocole de préparation du tampon mannitol :

Pour 300 mL de tampon mannitol :

Peser 12,3 g de tampon D-mannitol

Peser 363 mg de Tris HCl

Peser 7,68 g de saccharose

Déposer 60 µl d'une solution à 0,5M d'EDTA (peser 18,61 mg d'EDTA dans 100 µl d'eau distillée pour obtenir une solution à 0,5 M d'EDTA)

Diluer l'ensemble avec 240 ml d'eau distillée

Ajuster le pH à 7,2

Compléter le volume avec H<sub>2</sub>O jusqu'à 300 ml

La chaîne du froid est conservée tout au long du protocole. Les étapes suivies lors de l'extraction protéique totale sont les suivantes :

- Pesée du fragment musculaire
- Ajout du tampon mannitol (20µl/mg muscle)
- Broyage à l'ultra-thurax (3\*15 sec à vitesse maximale), nettoyage intégral de la tige de l'ultra-thurax avec 3 bains d'eau distillée de 600 ml à chaque nouveau fragment musculaire
- Centrifugation (20 min à 650 g)
- Séparation du surnageant et du culot
- Ajout de tampon mannitol au culot restant (13,33µl/mg muscle initialement pesé) et homogénéisation
- Broyage à l'ultra-thurax (3\*15 sec à vitesse maximale) de la solution tampon mannitol/culot, nettoyage intégral de la tige de l'ultra-thurax avec 3 bains d'eau distillée de 600 ml à chaque nouveau fragment musculaire
- Centrifugation de la solution tampon mannitol/culot (20 min à 650 G (rcf))
- Récupération du surnageant obtenu suite à la 2<sup>nde</sup> centrifugation, et regroupement avec le surnageant obtenu à la 1<sup>ère</sup> centrifugation

### Dosage de la concentration protéique

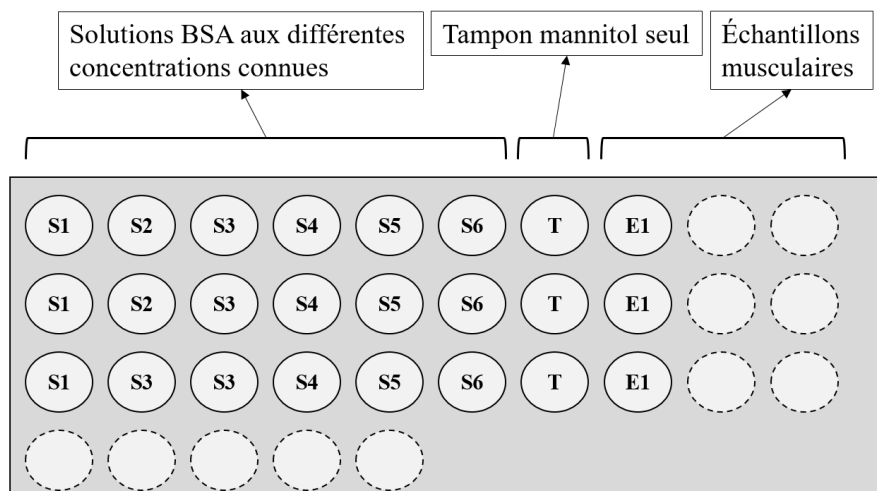
Le dosage de la concentration protéique des échantillons est réalisé le même jour que l'extraction protéique afin d'éviter un cycle de congélation supplémentaire et repose sur le principe de mesures d'absorbances comparatives avec une gamme BSA de différentes concentrations connues.

**Procédé général.** Dans chaque puit, 10 µl d'échantillon musculaire ou de solution de BSA (Bovin Albumin Serum) et 200 µl d'une solution spécifique (kit) sont déposés, soit un total de 210 µl/puit. Cette solution spécifique est obtenue par le mélange d'un réactif A dans un réactif B (dilution 1/50<sup>ème</sup>) qui proviennent du kit de dosage des protéines Thermo Scientific™. La plaque incube à 37°C dès lors que la solution spécifique (kit) entre en contact avec les échantillons déposés et la mesure d'absorbance est effectuée à 30 minutes d'incubation. Le kit utilisé présente notamment l'avantage d'une haute linéarité pour les gammes de BSA comprises entre 20 et 2 000 µg/ml.

**Gamme d'étalonnage.** La gamme d'étalonnage est réalisée avec des solutions de BSA de différentes concentrations connues (0 µg/µl, 0,4 µg/µl, 0,8 µg/µl, 1,2 µg/µl, 1,6 µg/µl, 2 µg/µl) en déposant 10 µl de solution (S) par puit mesurés en triplicatas.

**Échantillons musculaires.** Le volume d'échantillon musculaire (E) déposé dans les puits est de 10 µl/puit en triplicatas.

*Volumes (hors tampon) déposés dans les puits*



*Volumes déposés dans les puits*

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	T	E1
Volume eau distillée (µl)	10	8	6	4	2	0		
Volume BSA à 2 µg/µl (µl)	0	2	4	6	8	10		
Volume tampon mannitol (µl)							10	
Volume échantillon (µl)								10
Volume solution spécifique kit (µl)	200	200	200	200	200	200	200	200
Concentration (µg/µl)	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2		

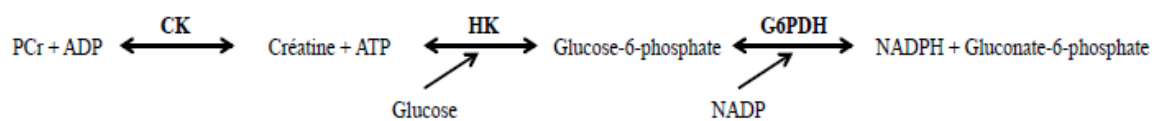
**Calculs et corrections.** La valeur d'absorbance du premier triplicata S1 contenant l'eau distillée uniquement (concentration BSA de 0 µg/µl) est systématiquement soustraite aux valeurs d'absorbance obtenues aux différentes concentrations de BSA. Pour rappel, l'extraction protéique est réalisée avec un tampon mannitol. Il est donc également nécessaire de soustraire systématiquement la valeur d'absorbance obtenue pour le triplicata du tampon mannitol seul aux valeurs d'absorbances obtenues pour les échantillons musculaires. Cela permet dans les 2 cas de s'affranchir du « bruit de fond » et de déduire la concentration protéique des différents échantillons musculaires grâce à la gamme d'étalonnage BSA. Le coefficient de corrélation  $R^2$  moyen de la droite d'étalonnage est de 0,9987 ; ce qui montre la précision de la gamme d'étalonnage assurant un calcul fiable de la concentration protéique des échantillons.

## SPECTROPHOTOMETRIE : MYOKINASE et CREATINE KINASE

- **Principe**

La myokinase (MK) est une enzyme qui catalyse l'interconversion d'ADP en ATP + AMP. La mesure de son activité maximale est évaluée à partir de l'apparition du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) dont l'absorbance est mesurée à 340 nm à 37°C. La cinétique d'apparition du NADPH permet de calculer l'activité maximale de MK.

La créatine kinase (CK) est une enzyme qui assure le transfert du radical phosphoryl de la PCr à l'ADP (qui devient ainsi de l'ATP). L'ajout de phosphocréatine au milieu réactionnel utilisé pour la MK a permis de mesurer l'activité de CK + MK selon les mêmes modalités (apparition du NADPH à 340 nm). La soustraction de l'activité myokinase (déterminée auparavant) permet de calculer l'activité de la CK.



- **Solutions et réactifs nécessaires**

Solution ou réactif	Lieu de stockage des produits ou solutions stocks
Hepes	Frigo
Mg Acetate	Frigo
Glucose	Aliquot congélateur
ADP	Aliquot congélateur
B-NADP	Poudre congelé
Hexokinase	Aliquot congelé
G6PDH	Aliquot congelé
PCr	Poudre congelé

- **Préparation du milieu réactionnel**

Mix	Sol Stock	C° finale	Pour 1 mL
Hepes	40mM	10mM	250µL
Mg Acetate	1M	4mM	4µL
Glucose	200mM	20mM	100µL
ADP	200mM	2mM	10µL
B-NADP			1.56mg
Hexokinase	0.5UI/µL	5.5UI/mL	10µL
G6PDH	0.3UI/µL	3UI/mL	10µL
H2O			616µL

Peser le B-NADP et ajuster les volumes de mix en fonction de la pesée. Préparer le mix et le laisser à température ambiante avant de l'utiliser.

Peser la PCr (82mg/mL) et la diluer dans H<sub>2</sub>O (à préparer dans un tube à part et prévoir au moins 500µL de large pour l'utilisation des injecteurs).

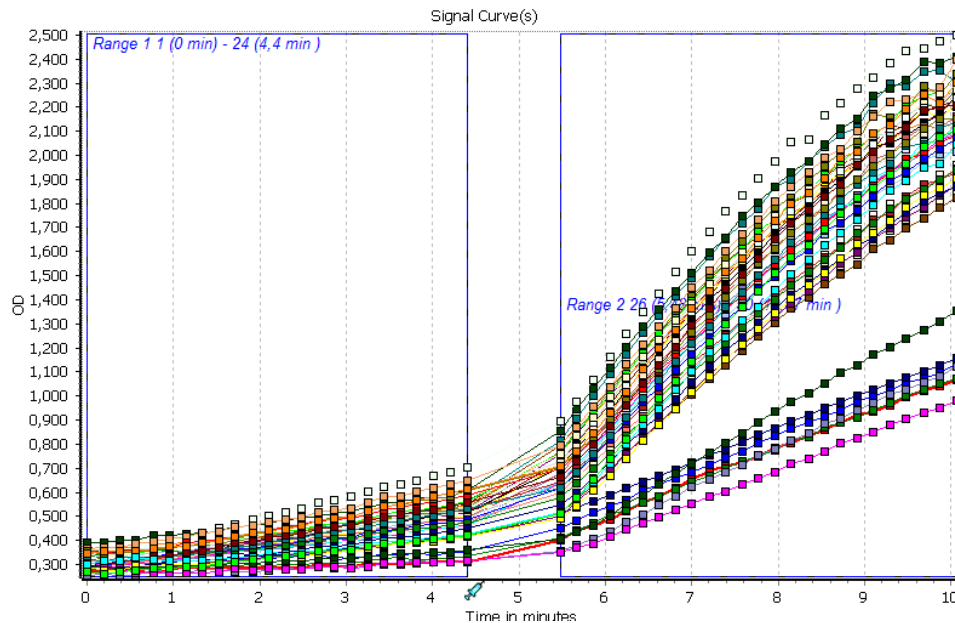
- **Mesure**

Mettre en marche les injecteurs avec la PCr. Appuyer deux fois sur le bouton de la pompe 1 (prévoir un petit becher pour récupérer la préparation). Refaire une deuxième fois. Récupérer ce qu'il y a dans le becher et le remettre dans le tube initial.

Pour un muscle humain 1µg de protéine est nécessaire.



Déposez dans une plaque 96 puits 10µL de surnageant dilué dans le tampon d'extraction puis ajouter 200µL de mix. Lancez la mesure sur 4 min pour lire la MK puis après injecter 6.5µL de PCr et poursuivre la lecture sur 4min pour lire la MK+CK.



- **Calcul de l'activité**

$$UI/mg = \frac{\Delta DO}{\text{min}} * \frac{\pi * R^2}{\epsilon * \text{Volume échantillon} * [C \text{ échantillon}]}$$

**ΔDO/min** : pente

**R<sup>2</sup>** : rayon du puits en cm. Pour les plaques Greiner 96 puits, c'est égal à 0.3195.

**ε** : coefficient d'extinction de la molécule en L/mmol/cm. Il est égal à 6.2 pour le B-NADH.

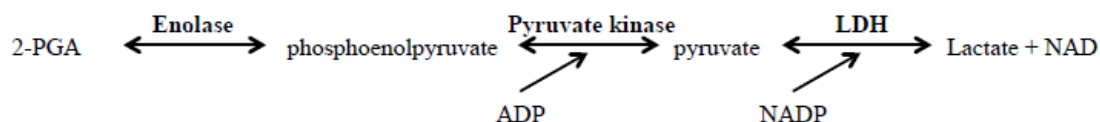
**Volume échantillon** : volume de l'échantillon déposé dans la plaque en µL.

**[C échantillon]** : concentration de l'échantillon dilué déposé dans le puits en µg/µL.

## SPECTROPHOTOMETRIE : ENOLASE

- **Principe**

L'énolase est une enzyme qui catalyse la conversion du 2-phospho-D-glycérate (2-PGA) en phosphoénolpyruvate au niveau de la neuvième étape de la glycolyse. Le dosage indirect de son activité repose sur le couplage à d'autres réactions qui aboutissent à l'oxydation du NADH dont la disparition est mesurée par absorbance à 340 nm à 37°C. La cinétique de disparition du NADH permet de calculer l'activité maximale de l'énolase.



- **Solutions et réactifs nécessaires**

Solution ou réactif	Lieu de stockage des produits ou des solutions stocks
Tampon Imidazole	Frigo
KCL	Frigo
MgAcetate	Frigo
Tampon B-NADH	Frigo
ADP	Aliquots congelés
PK	Aliquots congelés
LDH	Aliquots congelés
PGA	Aliquots congelés
B-NADH	Poudre congelée
BSA	Aliquots congelés

- **Préparation du milieu réactionnel**

Mix 5*	Sol stock	C° finale	Pour 1 mL
Imidazole	500mM	250 mM	500 µL
MgAcetate	1 M	20 mM	20 µL
KCl	1 M	200 mM	133,5 µL
BSA	2mg/ml	0.056%	284 µL
ADP	200mM	10mM	50 µL
PK	1,5 u/µL	15u/ml	10 µL
LDH	10u/µL	25µ/ml	2,5 µL

Preparer le mix 5\*.

Preparer le mix 1\*.

Mix 1*	Sol stock	Pour 4,5 mL
PGA	20mM	450 µL
Mix 5*		900 µL
BSA	2mg/ml	1350 µL
H2O		1350 µL
B-NADH	5mM	450 µL

- **Mesure**

Pour un muscle humain 5µg de protéine est nécessaire.  
Déposer 10µL de surnageant dilué dans le tampon d'extraction.  
Ajouter 200µL de mix.  
Lancer la mesure sur 4 min.

- **Calcul de l'activité**

$$UI/mg = \frac{\Delta DO}{min} * \frac{\pi * R^2}{\epsilon * Volume \text{ échantillon} * [C \text{ échantillon}]}$$

**ΔDO/min** : pente

**R<sup>2</sup>** : rayon du puits en cm. Pour les plaques Greiner 96 puits, c'est égal à 0,3195cm.

**ε** : coefficient d'extinction de la molécule en L/mmol/cm. Il est égal à 6,2 pour le B-NADH.

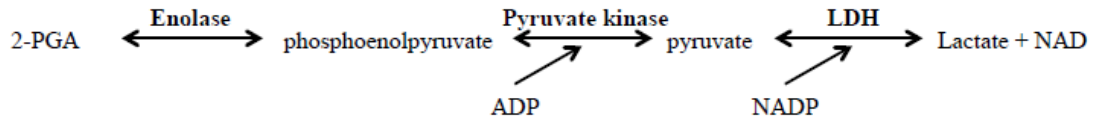
**Volume échantillon** : volume de l'échantillon déposé dans la plaque en µL.

**[C échantillon]** : concentration de l'échantillon dilué déposé dans le puits en µg/µL.

## SPECTROPHOTOMETRIE : LACTATE DESHYDROGENASE

- **Principe**

Le lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme qui catalyse la transformation du pyruvate en lactate, en association avec l'oxydation du NADH dont la disparition est mesurée à 340 nm.



- **Solutions et réactifs nécessaires**

Solution ou réactif	Lieu de stockage des produits ou des solutions stocks
<b>Imidazole</b>	Frigo
<b>KCl</b>	Frigo
<b>Pyruvate</b>	Aliquot congélateur
<b>B-NADH</b>	Poudre congélateur
<b>BSA</b>	Aliquot congélateur

- **Préparation du milieu réactionnel**

Produit	Concentration stock	Concentration finale	Pour 1mL
<b>Tampon imidazole</b>	500mM	50mM	100 µL
<b>KCl</b>	1M	200mM	200 µL
<b>Pyruvate</b>	1.25M	150mM	120µL
<b>B-NADH</b>		0.5mM	100µL
<b>BSA</b>	2mg/mL	0.07%	350µL
<b>H2O</b>			120 µL

Peser le B-NADH (3.55mg/mL).

Le diluer dans le tampon B-NADH (NA<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NAHCO<sub>3</sub>).

Préparer le mix et le laisser à température ambiante avant de l'utiliser.

- **Mesure**

Pour un muscle humain 5µg de protéine est nécessaire.

Déposer 10µL de surnageant dilué dans le tampon d'extraction.

Ajouter 200µL de mix.

Lancer la mesure sur 4 min.

- **Calcul de l'activité**

$$\text{UI/mg} = \frac{\Delta\text{DO}}{\text{min}} * \frac{\pi * \text{R}^2}{\epsilon * \text{Volume échantillon} * [\text{C échantillon}]}$$

**ΔDO/min** : pente

**R<sup>2</sup>** : rayon du puits en cm. Pour les plaques Greiner 96 puits, c'est égal à 0,3195cm.

**ε** : coefficient d'extinction de la molécule en L/mmol/cm. Il est égal à 6,2 pour le B-NADH.

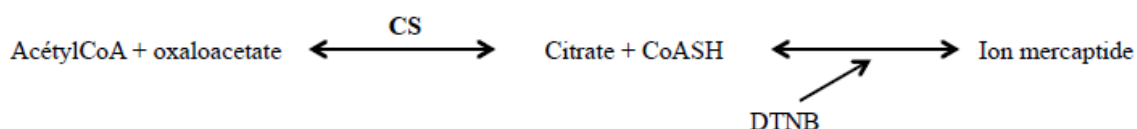
**Volume échantillon** : volume de l'échantillon déposé dans la plaque en µL.

**[C échantillon]** : concentration de l'échantillon dilué déposé dans le puits en µg/µL.

## SPECTROPHOTOMETRIE : CITRATE SYNTHASE

### • Principe

La citrate synthase (CS) est une enzyme du cycle de l'acide citrique qui catalyse la réaction transformant l'acétylCoA en CoASH. Le dosage indirect de l'activité de la CS repose sur le couplage avec une seconde réaction qui convertit, en présence de DTNB, le CoASH en ion mercaptide dont l'apparition est suivie à 412 nm.



### • Solutions et réactifs nécessaires

Solution ou réactif	Lieu de stockage des produits ou solutions stocks
<b>HEPES</b>	Frigo
<b>DTNB</b>	Poudre au frigo
<b>AcetylCoA</b>	Poudre au congélateur
<b>Oxaloacetic Acid</b>	Poudre au congélateur
<b>Tris Base</b>	Poudre à température ambiante

### • Préparation du milieu réactionnel

Mix	Sol Stock	C° finale	Pour 1mL
DTNB	1M	100mM	100µL
AcetylCoA	10M	300mM	30µL
Oxaloacetic acid	10M	500mM	50µL
H2O			810µL

Préparer le mix (le laisser à température ambiante et à l'abri de la lumière) :

#### **Oxaloacetic Acid :**

Peser 1,32mg/mL.

Diluer dans le Tris base.

#### **Tris base :**

Peser 12,11mg/mL.

Diluer dans H<sub>2</sub>O.

Ajuster le pH à 8 avec de l'acide chloridrique (préparer un volume conséquent pour mesurer le pH, environ 20mL).

#### **DTNB** (solution qui se garde 1 mois au réfrigérateur):

Peser 0,396mg/mL de DTNB (1.6 pour 4mL).

Diluer dans l'HEPES.

#### **AcetylCoA :** Peser 8,09mg/mL.

Diluer dans H<sub>2</sub>O.

- **Mesure**

Pour un muscle humain 10µg de protéine est nécessaire.  
Déposer 10µL de surnageant dilué dans le tampon d'extraction.  
Ajouter 200µL de mix.  
Lancer la mesure sur 8 min.

- **Calcul de l'activité**

$$UI/mg = \frac{\Delta DO}{\text{min}} * \frac{\pi * R^2}{\epsilon * \text{Volume échantillon} * [C \text{ échantillon}]}$$

**ΔDO/min** : pente

**R<sup>2</sup>** : rayon du puits en cm. Pour les plaques Greiner 96 puits, c'est égal à 0,3195cm.

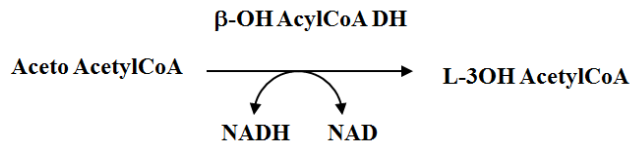
**ε** : coefficient d'extinction de la molécule en L/mmol/cm. Il est égal à 13,8.

**Volume échantillon** : volume de l'échantillon déposé dans la plaque en µL.

**[C échantillon]** : concentration de l'échantillon dilué déposé dans le puits en µg/µL.

# SPECTROPHOTOMETRIE : β-HYDROXYACYL-COA-DESHYDROGENASE

- **Principe**  
β-Hydroxy AcylCoA Deshydrogénase



- **Solutions et réactifs nécessaires**

Solution ou réactif	Lieu de stockage des produits ou des solutions stocks
<b>Imidazole</b>	Frigo
<b>Acetoacetyl CoA</b>	Aliquot congélateur
<b>B-NADH</b>	Poudre au congélateur
<b>BSA</b>	Aliquot congélateur
<b>KCL</b>	Frigo

- **Préparation du milieu réactionnel**

Mix	Sol Stock	C° finale	Pour 1 mL
<b>Imidazole</b>	500mM	150mM	300µL
<b>Acetoacetyl CoA</b>	1mM	0.1mM	100µL
<b>B-NADH</b>	5mM	0.5mM	100µL
<b>KCL</b>	1M	40mM	40µL
<b>BSA</b>	2mg/mL	0.05%	300µL
<b>H2O</b>			160µL

Peser le B-NADH (3.55mg/mL).

Le diluer dans le tampon B-NADH (NA<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NAHCO<sub>3</sub>)

Préparer le mix et le laisser à température ambiante avant de l'utiliser.

- **Mesure**

Pour un muscle humain 10µg de protéine est nécessaire.

Déposer 10µL de surnageant dilué dans le tampon d'extraction.

Ajouter 200µL de mix.

Lancer la mesure sur 4 min.

- **Calcul de l'activité**

$$\text{UI/mg} = \frac{\Delta \text{DO}}{\text{min}} * \frac{\pi * R^2}{\epsilon * \text{Volume échantillon} * [\text{C échantillon}]}$$

**ΔDO/min** : pente

**R<sup>2</sup>** : rayon du puits en cm. Pour les plaques Greiner 96 puits, c'est égal à 0,3195cm.

**ε** : coefficient d'extinction de la molécule en L/mmol/cm. Il est égal à 6,2 pour le B-NADH.

**Volume échantillon** : volume de l'échantillon déposé dans la plaque en µL.

**[C échantillon]** : concentration de l'échantillon dilué déposé dans le puits en µg/µL.

---

## SPECTROPHOTOMETRIE : COMPLEXE II DE LA CHAINE RESPIRATOIRE

---

- **Principe**

Le complexe II de la chaîne respiratoire permet l'oxydation du succinate dont il transfère les électrons au coenzyme Q<sub>10</sub> ou ubiquinone. Cette molécule très hydrophobe est remplacée dans l'essai par la décylubiquinone, beaucoup plus hydrophile. L'activité est mesurée en suivant la réduction de l'absorbance du 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCPIP) à 600 nm à 37°C. La ligne de base est mesurée pour pouvoir soustraire une réaction spontanée de transfert d'électrons au DCPIP.

- **Solutions et réactifs nécessaires**

Solution ou réactif	Lieu de stockage des produits ou solutions stocks
<b>K Phosphate</b>	Frigo
<b>BSA</b>	Aliquot congélateur
<b>Succinate</b>	Aliquot congélateur
<b>DCPIP</b>	Frigo
<b>KCN</b>	Poudre température ambiante
<b>ATP</b>	Aliquot congelé

- **Préparation du milieu réactionnel**

Mix	Sol Stock	C° finale	Pour 1mL
<b>K Phosphate</b>	500mM	25mM	50µL
<b>BSA</b>	50mg/mL		40µL
<b>Succinate</b>	200mM	20mM	100µL
<b>DCPIP</b>	5mM	0,23mM	45µL
<b>KCN</b>	10mM	1mM	100µL
<b>ATP</b>	10mM	0,1mM	10µL
<b>H2O</b>			655µL

Préparation de la décylubiquinone :

Allumer le bain marie à 37°C et la plaque chauffante à 100°C

Peser le dithionite et le diluer dans H<sub>2</sub>O

Faire chauffer le dithionite à 100°C environ 20min jusqu'à dissolution complète de celui-ci.

Mettre ensuite le dithionite dans la décylubiquinone décongelée.

Vortexer et mettre 20min dans le bain marie (la solution doit blanchir).

Peser le KCN (diluer dans H<sub>2</sub>O) et préparer le mix. Le garder à température ambiante et à l'abri de la lumière.

- **Mesure**

Tester la DO du mix seul (doit être environ à 1,5-2). Si inférieur, rajouter du DCPIP.

**Mise en marche des injecteurs**

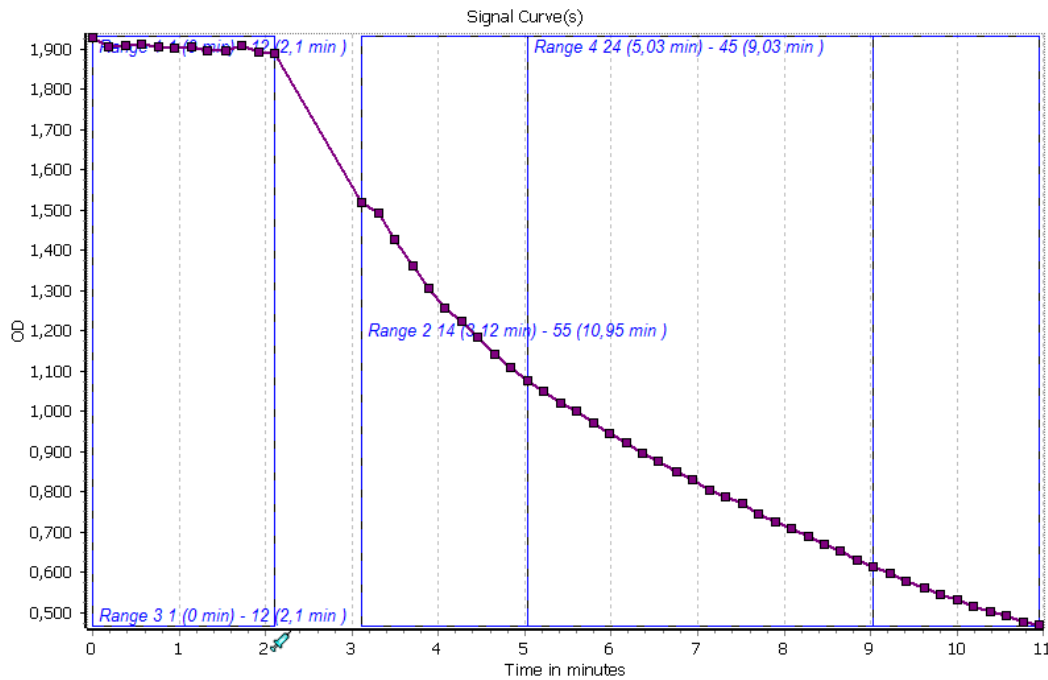
Appuyer deux fois sur le bouton de la pompe 1 (prévoir un petit becher pour récupérer la décylubiquinone). Refaire une deuxième fois.

Récupérer ce qu'il y a dans le becher et le remettre dans le tube initial.

Pour un muscle humain 5µg de protéine est nécessaire.



Déposer 10µL de surnageant dilué dans le tampon d'extraction.  
Ajouter 200µL de mix.  
Lancer la mesure sur 4 min pour lire la ligne de base.  
Injecter 0,5µL decylubiquinone.  
Lire de nouveau 4-5 min (si la réaction est trop rapide ou trop lente ajuster ce volume).



- **Calcul de l'activité**

$$UI/mg = \frac{\Delta DO}{min} * \frac{\pi * R^2}{\epsilon * Volume \text{ échantillon} * [C \text{ échantillon}]}$$

**ΔDO/min** : pente

**R<sup>2</sup>** : rayon du puits en cm. Pour les plaques Greiner 96 puits, c'est égal à 0,3195cm.

**ε** : coefficient d'extinction de la molécule en L/mmol/cm. Il est égal à 19,2 pour le DCPIP.

**Volume échantillon** : volume de l'échantillon déposé dans la plaque en µL.

**[C échantillon]** : concentration de l'échantillon dilué déposé dans le puits en µg/µL.

---

## SPECTROPHOTOMETRIE : COMPLEXE IV DE LA CHAINE RESPIRATOIRE

---

- **Principe**

Le complexe IV de la chaîne respiratoire permet l'oxydation du cytochrome c. Son activité est donc évaluée par la disparition du cytochrome c réduit qui absorbe à 550 nm à 37°C. L'accepteur naturel des électrons du complexe IV est l'oxygène.

- **Réactif nécessaire**

Solution ou réactif	Lieu de stockage du produit
<b>Cytochrome c</b>	Poudre congelé

- **Préparation du milieu réactionnel**

Peser le Cytochrome C (180µM) et le diluer H<sub>2</sub>O.

Préparer une solution « 100 % réduite » (réduire environ 10mL de la solution de CyC lorsque le volume du mix final est égal à 80mL).

Ajouter quelques grains de dithionite de sodium jusqu'au moment où la solution devient rose saumon.

Mesurer la DO de cette solution réduite.

Calculer la valeur de DO correspondant à 90% et 95% de la valeur précédente.

Réduire progressivement la solution de Cyc en ajoutant de la solution réduite (ajouter 1 à 2mL pour une solution de 80mL).

Tester la nouvelle DO à chaque fois.

Arrêter lorsque la solution de CyC atteint 90 à 95% de la solution 100% réduite.

- **Mesure**

Pour un muscle humain 10µg de protéine minimum est nécessaire.

Déposer 10µL de surnageant dilué dans le tampon d'extraction.

Ajouter 200µL de mix.

Lancez la mesure sur 4 min.

- **Calcul de l'activité**

$$UI/mg = \frac{\Delta DO}{\min} * \frac{\pi * R^2}{\epsilon * \text{Volume échantillon} * [C \text{ échantillon}]}$$

**ΔDO/min** : pente

**R<sup>2</sup>** : rayon du puits en cm. Pour les plaques Greiner 96 puits, c'est égal à 0,3195.

**ε** : coefficient d'extinction de la molécule en L/mmol/cm. Il est égal à 18,5 pour le Cyc.

**Volume échantillon** : volume de l'échantillon déposé dans la plaque en µL.

**[C échantillon]** : concentration de l'échantillon dilué déposé dans le puits en µg/µL.

---

## PROTOCOLE D'EXTRACTION POUR WESTERN BLOT

---

### *Composition du tampon des protéines solubles*

	1X	2X	FW	50ml de 2X	Fonction
Tris	20mM	40mM	121.14	0.2423g	Tampon
Sucrose	270mM	540mM	342.3	9.2421g	
EGTA	5mM	10mM	380.35	0.1902g	Inhibiteur de métalloprotéases
EDTA	1mM	2mM	372.24	0.0372g	Inhibiteur de métalloprotéases
Triton	1%	2%	100%	1ml	Détergent
Sodium orthovanadate	1mM	2mM	183.9	0.0184g	Inhibiteur ATPases, phosphatases alcalines et tyrosines
B-glycerophosphate	50mM	100mM	216.0	1.0800g	Inhibiteur de phosphatases
Sodium pyrophosphate	5mM	10mM	265.9	0.1328g	Inhibiteur de phosphatases
Sodium fluoride	50mM	100mM	41.99	0.2099g	Inhibiteur de phosphatases acides
DTT	1mM	2mM	154.26	0.0154g	Maintient les groupes SH à l'état réduit, réduit les ponts disulfides

---

Inhibiteurs de  
protéases

---

### *Composition du tampon d'extraction*

#### **Pour 2mL :**

Tampon protéines solubles : 1000µL

Inhibiteurs de protéases : 200 µL

H<sub>2</sub>O : 780 µL

Triton : 20 µL

#### **Procédure expérimentale**

La chaîne du froid est conservée tout au long du protocole. Les étapes sont les suivantes :

- Pesée du fragment musculaire
- Ajout du tampon d'extraction (20µl/mg muscle)
- Broyage à l'ultra-thurax (3\*15 sec à vitesse maximale), nettoyage intégral de la tige de l'ultra-thurax à chaque nouveau fragment musculaire
- Centrifugation (10 min à 10 000 g)
- Séparation du surnageant et du culot

#### **Dosage de la concentration protéique**

Identique au protocole d'extraction pour dosage enzymatique (fiche méthodologique 6)

---

## WESTERN BLOT

---

1. 10 µg de protéines ont été combinés avec le tampon Laemmli puis chauffés pendant 5 minutes à 95°C (sauf pour oxphos, chauffés pendant 3 minutes à 55°C).
2. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE (gels de 12% pour les oxphos et 10% pour les autres protéines) pendant 2 heures à une intensité constante de 40 mA. Ces protéines ont ensuite été transférées sur des membranes à pendant 2h30 à une intensité de 80 V.
3. Découper les membranes en fonctions des protéines à analyser.
4. Bloquer les membranes pendant 1h dans une solution de lait (5% de regilait dilué dans du TBST)
5. Incuber les membranes à 4°C pendant la nuit avec l'un des anticorps suivants dilué dans du lait (5% de regilait dilué dans du TBST)
  - a. complexe oxphos total (ab110413, Abcam, 1 : 1000)
    - i. complexe I : sous-unité NDUF8
    - ii. complexe II : sous-unité SDHB
    - iii. complexe III : sous-unité UQCRC2
    - iv. complexe IV : sous-unité MTCO1
    - v. complexe V : sous-unité ATP5A
  - b. GLUT4 (MA5-17176, Thermo Fisher Scientific, 1 : 1000)
  - c. CAII (anhydrase carbonique II, BIRBORB10230, VWR, 1 : 250)
  - d. CAIII (anhydrase carbonique III, BSBTPA1439, VWR, 1 : 1000)
  - e. MCT1 (transporteur monocarboxylate 1, AB3538P, Merck Millipore, 1 : 1000)
  - f. MCT4 (transporteur monocarboxylate 4, AB3316P, Merck Millipore, 1 : 1000)
6. Laver 3 fois les membranes pendant 10 minutes dans du TBST
7. Incuber les membranes pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-rabbit (A6154 ; Sigma-Aldrich) ou anti-mouse (610-1319 ; Rockland Immunochemicals, Limerick, PA, USA)
8. Laver 3 fois les membranes pendant 10 minutes dans du TBST
9. Révélation à l'ECL avec le kit Western blot ECL-Plus (Advansta, Menlo Park, CA, USA). Déposer la solution d'ECL pendant 4min sur les membranes
10. Faire les photos avec la GBox (Syngene, Cambridge, Royaume-Uni) à l'aide du logiciel GeneSnap.
11. Le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) a été utilisé pour les quantifications.



**Angèle Merlet**

Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la motricité EA7424, Univ. J Monnet St-Etienne, Univ. de Lyon, France ; Institute of Neuroscience, Univ. Catholique de Louvain, Belgique.

---

## **EFFETS D'UN ENTRAÎNEMENT EN ENDURANCE SUR LES CARACTÉRISTIQUES MUSCULAIRES DES PATIENTS DRÉPANOCYTAIRES HOMOZYGOTES**

---

### **RESUME**

La drépanocytose est une hémoglobinopathie génétique ayant pour conséquences des manifestations cliniques majeures, dont une anémie hémolytique chronique et sévère et des crises vaso-occlusives itératives. Cette pathologie s'accompagne également d'une intolérance à l'effort et d'altérations de la fonction et du tissu musculaire. Récemment, nous avons pu montrer, par une étude contrôlée et randomisée, l'innocuité et les bénéfices fonctionnels d'un programme d'entraînement en endurance, d'intensité modérée, chez des patients drépanocytaires. L'objectif de ce travail doctoral a été d'évaluer les effets de ce programme d'entraînement sur les caractéristiques musculaires de quarante patients drépanocytaires homozygotes. L'analyse des biopsies musculaires rapporte des adaptations tissulaires chez les patients entraînés, illustrées par une augmentation de la surface des myocytes, une amélioration de leur capacité oxydative, une augmentation du nombre de microvaisseaux sans modification de leur tortuosité, laissant tout de même supposer une meilleure oxygénation musculaire. L'excellente tolérance de ce mode d'entraînement semble reposer sur une plus faible mobilisation des voies anaérobies comme en témoigne la restriction ou la stabilité des activités enzymatiques associées à la glycolyse lactique et l'absence de modification du contenu musculaire en protéines impliquées dans la régulation du pH. Par ailleurs, cet entraînement n'a pas engendré de dégradation tissulaire notable. Ainsi, cet entraînement en endurance, d'intensité modérée, a non seulement apporté des bénéfices fonctionnels en toute innocuité, mais également réduit les dysfonctionnements tissulaires musculaires préalablement observés dans cette pathologie. Cette thérapie par l'exercice peut donc être considéré comme une stratégie adjuvante prometteuse pour les patients drépanocytaires.

---

## **EFFECT OF ENDURANCE TRAINING ON MUSCLE CHARACTERISTICS OF HOMOZYGOUS SICKLE CELL DISEASE PATIENTS**

---

### **ABSTRACT**

Sickle cell disease is a genetic hemoglobinopathy that results in major clinical manifestations, including chronic and severe hemolytic anemia and iterative vaso-occlusive crisis. This pathology is also accompanied by exercise intolerance and alterations in muscle function and tissue. Recently, we demonstrated, through a randomized controlled study, the safety and functional benefits of a moderate-intensity endurance exercise training program in sickle cell disease patients. The aim of this doctoral work was to evaluate the effects of this training program on the muscle characteristics of forty homozygous sickle cell disease patients. The analysis of muscle biopsies reported muscle tissue adaptations in trained patients, illustrated by an increase in the surface area of the myocytes, an improvement in their oxidative capacity, an increase in the number of microvessels without modification of their tortuosity, still suggesting better muscle oxygenation. The excellent tolerance of this training mode seems to be based on a lower mobilization of the anaerobic pathways, as evidenced by the restriction or stability of enzymatic activities associated with lactic glycolysis and the lack of any modification of the muscle protein content involved in pH regulation. Moreover, this training did not result in any significant tissue degradation. Thus, a moderate-intensity endurance training provided functional benefits in complete safety, but also reduced muscle tissue dysfunctions previously observed in this pathology. This exercise therapy can therefore be considered a promising adjuvant strategy for sickle cell disease patients.