



HAL
open science

Vasculopathie et inflammation dans la drépanocytose : i) étude des déterminants de la vasculopathie chronique en Afrique sub-saharienne : ii) dynamique inflammatoire des polynucléaires neutrophiles sous thérapeutiques transfusionnelles au sein d'une cohorte française

Abdoul Karim Dembele

► **To cite this version:**

Abdoul Karim Dembele. Vasculopathie et inflammation dans la drépanocytose : i) étude des déterminants de la vasculopathie chronique en Afrique sub-saharienne : ii) dynamique inflammatoire des polynucléaires neutrophiles sous thérapeutiques transfusionnelles au sein d'une cohorte française. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP7172 . tel-03277920

HAL Id: tel-03277920

<https://theses.hal.science/tel-03277920>

Submitted on 5 Jul 2021

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.



Université
de Paris

Université de Paris

École doctorale 562 - Bio Sorbonne Paris Cité

INSERM UMR_S1134 BIOLOGIE INTEGREE

DU GLOBULE ROUGE

Vasculopathie et inflammation dans la drépanocytose : i) étude des déterminants de la vasculopathie chronique en Afrique sub-saharienne ; ii) dynamique inflammatoire des polynucléaires neutrophiles sous thérapeutiques transfusionnelles au sein d'une cohorte française

Abdoul Karim DEMBELE

Thèse de Doctorat : Physiologie et Physiopathologie

Dirigée par Pr. Caroline LE VAN KIM

Présentée et soutenue publiquement, le 12 Novembre 2020

Devant le jury composé de :

Pr Léon THSILOLO

Pr Loïc GARÇON

Pr Jean-Philippe ROSA

Pr Dapa DIALLO

Pr Caroline LE VAN KIM

Dr Claudine LAPOUMEROU LIE

Pr Jacques ELION

Université de Kinshasa

Université de Picardie Jules Verne

Université Paris-Est Créteil

Université de Bamako

Université de Paris

Université de Paris

Université de Paris

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

Co-encadrante

Invité

Table des matières

Abréviations	4
Résumé	7
Abstract	8
Introduction	9
1.1 Définition et structure de l'hémoglobine	10
1.2 Synthèse de l'hémoglobine	13
1.3 Fonctions de l'hémoglobine	15
1.4.1 Les anomalies qualitatives	17
1.4.2 Les anomalies quantitatives	18
2 La drépanocytose	19
2.1 Définition	19
2.1.1 La mutation β^S	19
2.1.2 Hétérogénéité génétique des syndromes drépanocytaires majeurs (SDM)	20
2.1.2.1 Les autres variants communs : HbC et HbE	21
2.1.2.2 Variants semi-rares et rares	22
2.2 Grandes dates dans l'histoire de la drépanocytose	23
2.2.1 Description clinique	23
2.2.2 Description biologique	23
2.2.3 Prise en charge	23
2.2.4 La drépanocytose aujourd'hui	25
1.3 Physiopathologie de la drépanocytose	28
1.3.1 Polymérisation de l'hémoglobine S	31
1.3.1.1 Mécanisme de la polymérisation	31
1.3.1.2 Facteurs modulant la polymérisation de l'HbS.....	32
1.3.2 Conséquences fonctionnelles de la polymérisation au niveau érythrocytaire	33
1.3.2.1 Déshydratation cellulaire.....	33
1.3.2.2 Altérations de la membrane du GR	35
1.3.3 Mécanismes de la vaso-occlusion	36
1.3.3.1 Interactions cellulaires et adhérence anormale à l'endothélium.....	37
1.3.3.2 Inflammation stérile	41
1.3.3.3 Dysfonction endothéliale	43
1.4 Présentation clinique	46
1.4.1 Complications aiguës de la drépanocytose.....	46
1.4.1.1 Crise vaso-occlusive osseuse.....	46
1.4.1.2 Syndrome thoracique aigu (STA)	47
1.4.1.3 Priapisme aigu	47
1.4.1.4 Séquestration splénique aiguë	48
1.4.2 Complications chroniques	49
1.4.2.1 Hypertension artérielle pulmonaire	49
1.4.2.2 Néphropathie	50
1.4.2.3 Ulcères de jambe	50
1.4.2.4 Ostéonécrose aseptique.....	51
1.4.2.5 Rétinopathie	51
1.4.2.6 Vasculopathie cérébrale	51
1.4.3 Variabilité des phénotypes cliniques.....	53
1.4.3.1 Le paradigme des deux sous-phénotypes	54
1.4.3.2 Facteurs de modulation de la sévérité de la drépanocytose.....	55

1.5	Traitement	60
1.5.1	Prévention du risque infectieux.....	60
1.5.2	Traitement symptomatique.....	60
1.5.3	Hydroxycarbamide (HC).....	61
1.5.5	Greffe de cellules souches hématopoïétiques.....	63
1.6	Perspectives diagnostiques et thérapeutiques	64
1.6.1	Développements du diagnostic biologique	64
1.6.2	Avancées thérapeutiques.....	66
1.6.2.1	Nouvelles approches pharmacologiques.....	66
1.6.2.2	Thérapie génique.....	67
	Objectifs	70
	Résultats	71
	1. Etude des déterminants de la vasculopathie chronique en Afrique sub saharienne ...	71
1.1	Article 1 : Mechanistic and biological determinants of sickle cell disease vasculopathy in sub-Saharan Africa : the BIOCADRE study	73
1.2.	Article 2 : Cell-Derived Microparticles and Sickle Cell Disease Chronic Vasculopathy in sub-Saharan Africa: a multinational Study.....	96
2.	Transfusion et prise en charge de la vasculopathie cérébrale : effet sur l'activation et le vieillissement des polynucléaires neutrophiles.....	125
2.1	Article 3 : Inflammatory neutrophil phenotype in children with sickle cell disease despite chronic exchange transfusion program: a cause of persistent cerebral vasculopathy ?.....	126
	Discussion générale et perspectives	144
	Références bibliographiques	150

Abréviations

2,3-BPG	: 2,3-bis-phosphoglycérate
<i>APOL1</i>	: gène de l'Apolipoprotéine L1
AVC	: Accident Vasculaire Cérébral
<i>BCL11a</i>	: gene de <i>B-Cell Lymphoma/Leukemia 11a</i>
BIOCADRE	: Biologie Cœur Artère DRÉpanocytose
CADRE	: Cœur Artères DRÉpanocytose
CAM	: Molécule d'adhérence cellulaire
CD62L	: L-sélectine
CNT	: Centre National de Transfusion Sanguine
Cp	: Centipoises
CRLD	: Centre de Recherche et de Lutte contre la Drépanocytose
CVO	: Crise Vaso-Occlusive
CXCL4	: Ligand 4 des CXC-chimiokines
<i>CXCR2</i>	: Récepteur 2 des CXC-chimiokines
<i>CXCR4</i>	: Récepteur 4 des CXC-chimiokines
<i>DARC</i>	: gène du récepteur de l'antigène Duffy pour les chimiokines
DFGe	: estimation du Débit de Filtration Glomérulaire
e-DAMP	: motifs moléculaires associés aux dommages des érythrocytes
ESL-1	: Ligand 1 de la E sélectine
ET-1	: Endothéline-1
ET-A	: Récepteur A de l'endothéline
ET-B	: Récepteur B de l'endothéline
<i>G6PD</i>	: gène de la Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
GB	: Globules blancs
G-CSF	: Facteur de stimulation des colonies de granulocytes
GM-CSF	: Facteur de stimulation des colonies de granulocytes macrophages
GR	: Globule rouge
GR SS	: Globule rouge drépanocytaire
Hb	: Hémoglobine
HbA	: Hémoglobine adulte A
<i>HBB</i>	: gène de la chaîne de β -globine

<i>HBG2</i>	: gène de la chaîne de $G\gamma$ -globine
HbC	: Hémoglobine C
HbF	: Hémoglobine fœtale
HbS	: Hémoglobine S
<i>HBS11-MYB</i>	: région inter génique HBS11-MYB
HC	: Hydroxycarbamide
HMGB1	: High-mobility group box 1
<i>HMOX1</i>	: gène de l'Hème Oxygénase 1
<i>HMOX2</i>	: gène de l'Hème Oxygénase 2
HPLC	: Chromatographie liquide hautes performances
HTAP	: Hypertension artérielle pulmonaire
IAP	: Protéine associée aux intégrines
ICAM-1	: Molécule d'adhérence intercellulaire-1
ICAM-4	: Molécule d'adhérence intercellulaire-4
IL-1b	: Interleukine 1bêta
IL-8	: Interleukine 8
ISTH	: <i>International Society of Thrombosis and Hemostasis</i>
LDH	: Lactate déshydrogénase
LFA-1	: <i>Lymphocyte Function Antigen-1</i> (intégrine $\alpha_L\beta_2$)
LPS	: Lipopolysaccharide
Lu/BCAM	: <i>Lutheran/Basal Cell Adhesion Molecule</i>
MAC-1	: <i>Macrophage-1 antigen</i> (intégrine $\alpha_M\beta_2$)
MPO	: Myéloperoxydase
MPs	: Microparticules cellulaires
NE	: Elastase des polynucléaires neutrophiles
NET	: Pièges extracellulaires neutrophiles
NLRP3	: <i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3</i>
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PAMP	: Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PNN	: Polynucléaire neutrophile
PS	: Phosphatidylsérine
PSGL-1	: Ligand1 de la P-sélectine
ROS	: Espèces réactives de l'oxygène
SDM	: Syndrome drépanocytaire majeur

STA	: Syndrome thoracique aigu
TLR4	: <i>Toll Like Receptor 4</i>
TNF	: Facteur de nécrose tumoral
TSP	: Thrombospondine
UNESCO	: Organisation des Nations Unies pour l'Education, la Science et la Culture
VCAM-1	: Molécule d'adhérence cellulaires vasculaire 1
VLA-4	: <i>Very Late Antigen-4</i> ou Intégrine $\alpha_4\beta_1$

Résumé

La drépanocytose est une maladie génétique grave du globule rouge, due à la substitution d'un acide glutamique par une valine en position 6 dans la β -globine, résultant en la production d'une hémoglobine anormale (HbS). Elle se caractérise, dans sa forme classique, par une anémie chronique, des phénomènes vaso-occlusifs aigus, le plus caractéristique étant la crise vaso-occlusive douloureuse, et une susceptibilité extrême aux infections. En France, c'est la maladie génétique avec la plus forte incidence.

Bien que très fréquente en Afrique subsaharienne (85% des naissances drépanocytaires), son histoire naturelle y est mal connue. Elle est maintenant considérée globalement comme une maladie vasculaire, mais les mécanismes précis de cette vasculopathie ainsi que les facteurs de risque associés ne sont pas clairement établis. Les études réalisées sur les séries patients aux Etats-Unis ont fait proposer l'existence de deux sous-phénotypes : le sous-phénotype «hémolyse/dysfonction endothéliale», d'une part, et le sous-phénotype «hyperviscosité/ vaso-occlusion » d'autre part, chacun associé à un groupe spécifique de complications.

Dans la première partie de notre travail, nous avons cherché à définir les déterminants de la vasculopathie drépanocytaire en Afrique sub-saharienne. Pour ce faire, nous avons réalisé une étude cas-témoins sur 232 adultes homozygotes SS suivis depuis plus de 5 ans à Dakar (Sénégal) et Bamako (Mali) dans deux des cinq centres de la cohorte CADRE, plus grande cohorte Africaine établie depuis 2011 (Cœur Artère Drépanocytose, NCT03114137). Les patients étaient caractérisés selon la présence ou l'absence des complications suivantes : vitesse de régurgitation tricuspидienne (VRT) > 2,5 m/s (associée à une hypertension pulmonaire), micro/macroalbuminurie, ulcère de jambe, priapisme, ostéonécrose, et rétinopathie. Au-delà des examens biologiques de routine, nous avons analysé chez ces patients le taux et la répartition cellulaire des microparticules circulantes, la fonction micro-vasculaire (index d'hyperhémie réactionnelle), les paramètres de viscosité sanguine, ainsi que les facteurs génétiques de modulation connus de la sévérité de la maladie (variants des gènes *BCL11a*, *HBS11-myb 37*, *HBG2*, *HMOX2* et *1*, *APO1*, déficit en G6PD et déterminants α -thalassémiques). Nos résultats qui documentent pour la première fois l'ensemble de ces paramètres dans une cohorte de patients en Afrique sub-saharienne, ne mettent pas en évidence de cluster de complications et questionnent la pertinence d'une dichotomie en deux sous phénotypes des complications vasculaires de la drépanocytose dans cette région du monde.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons voulu rechercher des causes à l'inconstance du bénéfice du traitement de référence de la vasculopathie cérébrale : la transfusion sanguine. Ainsi, nous avons étudié le phénotype des polynucléaires neutrophiles (PNN), dont la participation à la pathogénie de la drépanocytose a été récemment mise en évidence, chez 54 enfants sous régime transfusionnel en France. Cette étude est la première à montrer que les PNN gardent un phénotype activé proinflammatoire et «âgé» en dépit des transfusions, néanmoins atténué quand les enfants étaient également traités par l'hydroxycarbamide. Nos résultats contribuent à la compréhension de la progression de la vasculopathie et de l'efficacité partielle des échanges transfusionnels et ouvrent des voies nouvelles d'investigation pour l'optimisation de la prise en charge de la vasculopathie cérébrale.

Mots-clés : drépanocytose, vasculopathie, Afrique subsaharienne, microparticules, transfusion sanguine, polynucléaires neutrophiles

Abstract

Sickle cell disease is a severe genetic disease of the red blood cell caused by the substitution of glutamic acid by a valine at position 6 in the β -globin chain, resulting in the production of an abnormal hemoglobin (HbS). Its classic form is characterized by chronic anemia, acute vaso-occlusive events, the most characteristic being the painful vaso-occlusive crisis, and extreme susceptibility to infections. In France, it is the genetic disease with the highest incidence

Even though it is very common in sub-Saharan Africa (85% of the newborns with sickle cell disease), its natural history is poorly understood in this part of the world. It is now considered globally as a vascular disease, but the precise mechanisms of this vasculopathy as well as the associated risk factors are not clearly established. Studies carried out on series of patients in the United States have suggested the existence of two sub-phenotypes: the “hemolysis/endothelial dysfunction” sub-phenotype, on the one hand, and the “hyperviscosity/vaso-occlusion” sub-phenotype, on the other, each being associated with a specific group of complications.

In the first part of our work, we sought to define the determinants of the sickle cell vasculopathy in sub-Saharan Africa. To this purpose, we carried out a case-control study on 232 homozygous SS adults followed for more than 5 years in Dakar (Senegal) and Bamako (Mali) in two of the five centers of the CADRE cohort, the largest African cohort established since 2011 (Cœur, Artère, DRépanocytose / *Heart, Artery, Sickle Cell Disease*, NCT03114137). Patients were characterized according to the presence or absence of the following complications: tricuspid regurgitation velocity (TRV) > 2.5 m/s (associated with pulmonary hypertension), micro/macroalbuminuria, leg ulcer, priapism, osteonecrosis, and retinopathy. In these patients beyond the routine biological examinations, we analyzed the level and cellular distribution of circulating microparticles, the microvascular function (reactive hyperemia index), blood viscosity parameters, as well as the genetic factors known to modulate the disease severity (variants of the *BCL11a*, *HBS11-myb* 37, *HBG2*, *HMOX2* and *1* genes, *APO1*, G6PD deficiency and α -thalassemia determinants). Our results document for the first time all these parameters in a cohort of patients in sub-Saharan Africa. They do not highlight clusters of complications and question the relevance of a dichotomy in two sub-phenotypes of sickle cell disease vascular complications of in that region of the world.

In the second part of our work, we aimed at looking for causes to the beneficial inconstancy of the standard treatment for cerebral vasculopathy: blood transfusion. To that purpose, we studied the phenotype of polynuclear neutrophils (PNN), whose participation in the pathogenesis of sickle cell disease was recently demonstrated, in 54 children under a transfusion regimen in France. This study is the first to show that despite transfusions PNNs retain an activated proinflammatory and "aged" phenotype, which was attenuated when children were concomitantly treated with hydroxycarbamide. Our results contribute to the understanding of the vasculopathy progression and the partial efficacy of transfusion exchanges and open new avenues of investigation for optimizing the management of cerebral vasculopathy.

Keywords: sickle cell anemia, vasculopathy, sub-Saharan Africa, microparticles, blood transfusion, polynuclear neutrophils

Introduction

Les pathologies génétiques du globule rouge (GR) sont les maladies monogéniques les plus répandues dans le monde. Globalement, 16% de la population mondiale (1/6 individu, 1,3 milliard d'individus, sont porteurs d'au moins un gène responsable de ces pathologies (Narla Mohandas et al., 2008). Dans l'immense majorité des cas, il s'agit de porteurs sains auxquels ce statut a conféré un avantage sélectif contre les complications graves du paludisme. Les allèles impliqués ont été maintenus et sélectionnés dans toutes les régions du monde où le paludisme est (ou a été) endémique. Les zones de plus forte prévalence correspondent donc à la ceinture palustre, large zone tropicale s'étendant actuellement de l'Amérique du Sud, à l'Afrique subsaharienne, aux zones côtières de la péninsule arabique, au sous-continent indien et à l'Asie du Sud-Est et extrême orientale. A noter que le paludisme a aussi été longtemps présent dans tout le pourtour méditerranéen. L'anomalie la plus fréquente est le déficit d'une enzyme métabolique du GR, la Glucose-6-Phosphate Deshydrogénase (G6PD) qui affecte plus de 450 000 000 d'individus (> 6% de la population mondiale). Viennent ensuite les maladies de l'hémoglobine (drépanocytose, 5% de la population mondiale et thalassémies), puis les anomalies de la membrane du GR avec en particulier l'ovalocytose qui peut atteindre des prévalences de 5 à 25% dans les populations mélanésiennes et du Sud-Est asiatique. La coexistence de ces allèles pathologiques dans les mêmes populations fait que la présence simultanée d'allèles pathologiques de gènes différents n'est pas rare. Pour exemple, au Laos, 20% seulement de la population n'est pas porteuse d'au moins un allèle anormal des gènes globine (Sicard et al., 1979). Les formes graves, en particulier de drépanocytose et de thalassémies, sont à 80% présentes dans des pays à bas revenus où elles contribuent de façon significative à la mortalité avant 5 ans. Dans ces pays, la transition épidémiologique, avec les progrès de la prise en charge des maladies infectieuses et de la malnutrition, fait émerger ces

maladies génétiques. Enfin, les mouvements de populations vers les pays à haut revenus globalisent ce groupe de pathologies et en font un problème majeur de santé publique.

1. L'hémoglobine humaine

Pour comprendre les hémoglobinopathies et la drépanocytose en particulier, il paraît essentiel de rappeler quelques notions de base sur la structure, la fonction et la synthèse de l'hémoglobine (Hb) ainsi que sur l'organisation des gènes de cette hémoglobine et les principaux mécanismes de la régulation de leur expression.

1.1 Définition et structure de l'hémoglobine

L'hémoglobine, est la protéine soluble majeure des globules rouges (GR). Elle est essentielle à la vie par sa fonction capitale de transport de l'oxygène (Bunn et al. 1986). Il existe différentes hémoglobines qui sont toutes des tétramères et résultent de l'association de 4 chaînes polypeptidiques, dites chaînes de globine, semblables deux à deux. La nature de ces chaînes caractérise le type d'hémoglobine. Deux chaînes de type " α " (ζ ou α) s'apparient systématiquement à deux chaînes de type "non α " (ε , γ , δ ou β), permettant la production successive des différentes hémoglobines au cours du développement ontogénique (**Figure 1**). Celui-ci est caractérisé par deux commutations d'une part dans l'expression des chaînes de globine et d'autre part, dans le siège de l'érythropoïèse, ce processus qui démarre d'une cellule souche pour se différencier en GR. Ainsi, durant les premières semaines post-conceptionnelles, les hémoglobines embryonnaires Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) et Portland ($\zeta_2\gamma_2$) sont exprimées dans le sac vitellin. Puis celles-ci sont rapidement remplacées par l'hémoglobine fœtale (HbF, $\alpha_2\gamma_2$) de façon concomitante avec la migration de l'érythropoïèse dans le foie fœtal

; c'est la commutation embryonnaire/fœtale qui est terminée à 6 semaines de gestation. L'HbF est l'hémoglobine prédominante pendant la vie fœtale jusqu'à la seconde commutation fœtale/adulte à partir de la 30^{ème} semaine de gestation. L'HbF est alors progressivement remplacée par l'hémoglobine adulte (HbA, $\alpha_2\beta_2$) et l'érythropoïèse migre dans son siège définitif : la moelle osseuse. Cette commutation se poursuit au-delà de la naissance ; l'HbA atteint son taux définitif vers l'âge d'un an, l'HbF ne persistant alors normalement qu'à l'état de traces (<1%). Au stade adulte, l'HbA (97,5%) est associée à une hémoglobine minoritaire l'HbA₂, ($\alpha_2\delta_2$) (2,5%).

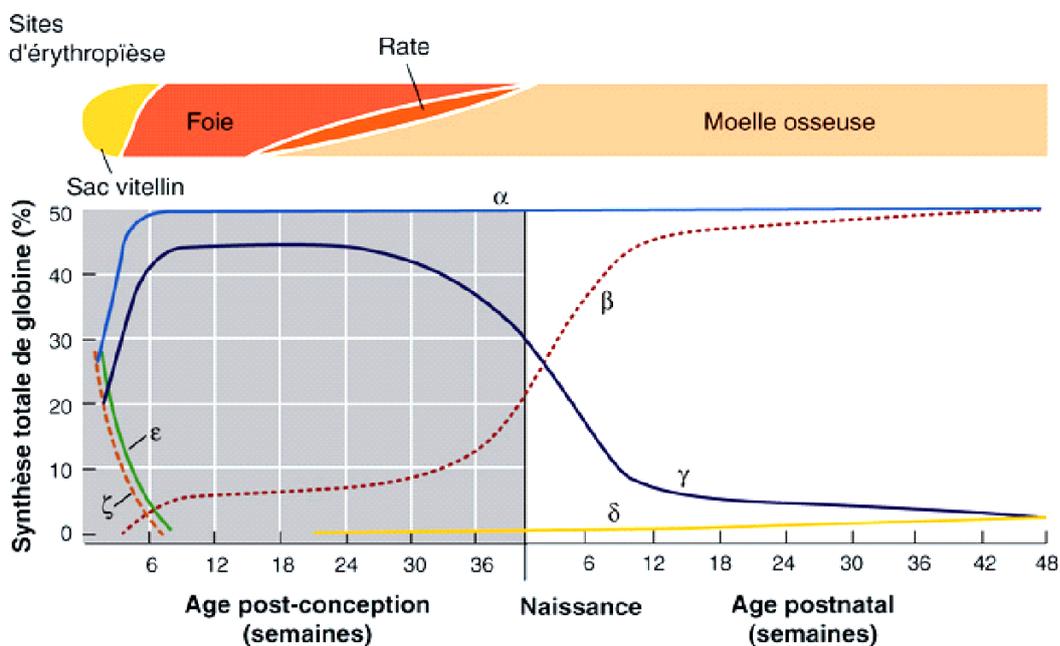


Figure 1: Sites d'érythropoïèse et expression des chaînes de globine du stade embryonnaire au stade adulte (Bunn et al. 1986).

Le profil d'expression des différentes hémoglobines permet de comprendre pourquoi les anomalies de la chaîne α s'expriment cliniquement dès la période néonatale, voire anténatale, alors que les anomalies de la chaîne β s'expriment à partir de 3-4 mois de vie et sont parfois de diagnostic difficile en période néonatale.

L'hémoglobine humaine présente, comme toutes les protéines, une structure primaire définie par la séquence en acides aminés (aa) des chaînes de globine (141 aa pour les chaînes de type α et

146 aa pour les chaînes de type β), une structure secondaire (essentiellement alternance de 8 hélices α reliées par de courts segment non- α), une structure tertiaire définie par l'arrangement tridimensionnel des hélices les unes par rapport aux autres au sein d'un monomère de globine et qui délimite une poche de l'hème, et une structure quaternaire définie par l'assemblage des monomères au sein du tétramère (**Figure 2**).

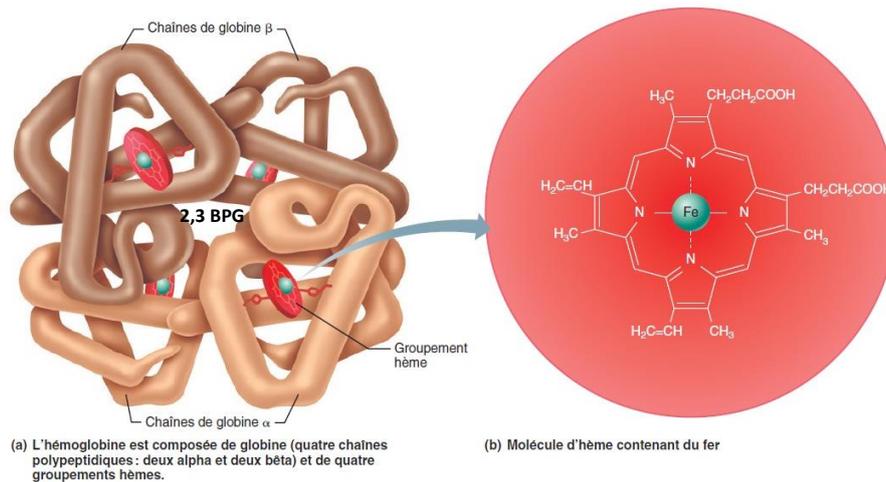


Figure 2 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine adulte, adaptée de. Le tétramère possède 4 poches de l'hème qui sont chacune site de fixation pour une molécule d' O_2 . Au centre de la molécule, la cavité centrale est le site de fixation du 2,3-BPG, régulateur majeur de la fixation de l' O_2 par l'hémoglobine. L'hème est une structure porphyrique comportant un atome de Fer en son centre (Bunn et al. 1986).

La poche de l'hème est le site de fixation de l' O_2 . Dans le tétramère, les chaînes α et β sont assemblées par des liaisons de faible énergie formant des contacts serrés (contacts $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_2$) et par des contacts plus lâches (contacts $\alpha_1\beta_2$ et $\alpha_2\beta_1$). Les premiers jouent un rôle essentiel dans la stabilité du tétramère et les seconds dans le processus de transition allostérique. A l'état désoxygéné, une poche centrale située entre les 4 sous-unités sert de site de fixation au 2,3-BPG (2,3-bis-phosphoglycérate), ligand régulateur majeur de la fonction de fixation de l' O_2 (Lapie et al., 2006).

1.2 Synthèse de l'hémoglobine

Les différentes chaînes de globine sont codées par des gènes organisés en deux "familles" : la famille alpha, localisée sur le chromosome 16, et la famille bêta, sur le chromosome 11. Les gènes sont organisés de 5' en 3' selon leur ordre d'expression au cours du développement : dans la famille α , gène ζ embryonnaire, $\alpha 2$ et $\alpha 1$ fœtaux/adultes ; dans la famille β , gène ϵ embryonnaire, $G\gamma$ et $A\gamma$ fœtaux, δ (minoritaire) et β adultes (**Figure 3**).

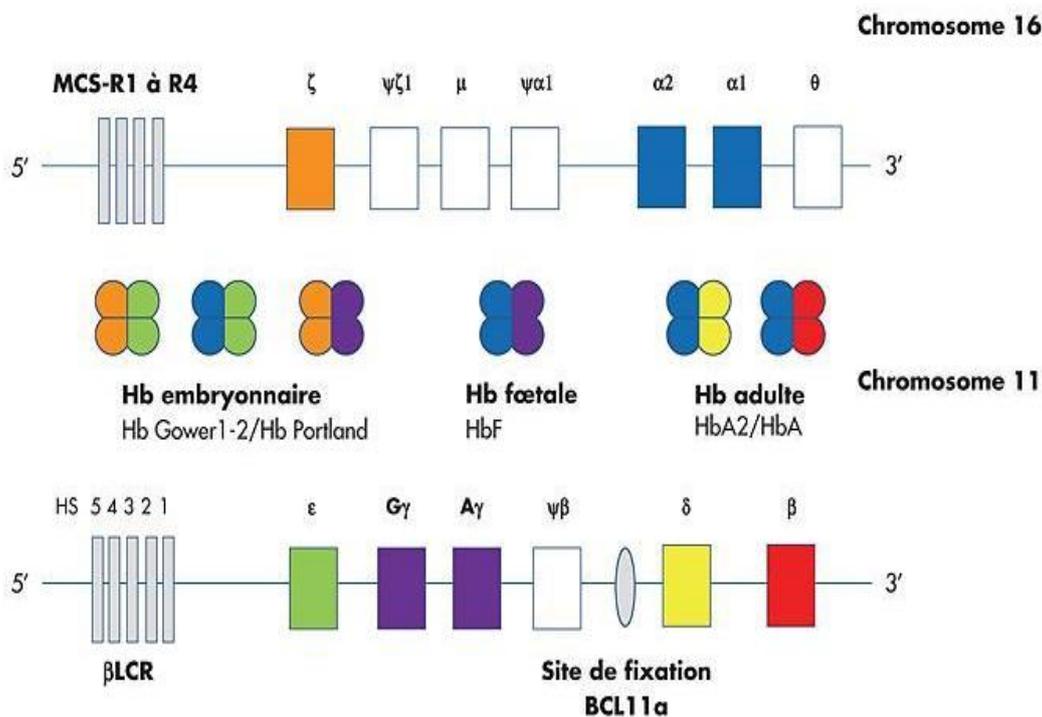


Figure 3 : Organisation des deux familles de gènes-globine. La famille α -globine est localisée sur le chromosome 16, la famille β -globine sur le chromosome 11. Les gènes sont représentés par des rectangles colorés. Les rectangles blancs sont des pseudogènes non exprimés, vestiges de l'évolution. En amont du locus β -globine, cinq sites hypersensibles à l'ADNase I (HS1 \rightarrow 5) constituent une zone régulatrice majeure : le LCR (« *regulatory locus control region* »). Sur le chromosome 16 (locus α -globine), un site unique, correspondant à une zone régulatrice majeure, le site MCS-R2 (connu aussi comme HS-40), a été mis en évidence 40 kb en amont du gène ζ (Couque et al., 2016).

Une molécule d'hémoglobine associant deux chaînes de globine produites par des gènes localisés sur le chromosome 16 (chaînes de type α) et deux chaînes produites par des gènes situés sur le chromosome 11 (chaînes de type β), l'existence d'un système de régulation très strict est primordiale pour maintenir un rapport d'expression α/β (ou non- α) égal à 1. En effet,

toute variation de ce rapport entraînerait un déséquilibre d'expression des chaînes de globine, aboutissant à l'existence d'une fraction de chaînes libres non appariées à leur partenaire dans le tétramère hémoglobinique et délétères pour le globule rouge (voir plus loin le paragraphe « thalassémies »). Cette régulation doit aussi assurer une production équilibrée de chaînes α et β à partir de 2 gènes α dupliqués sur le chromosome 16 (4 gènes par génome diploïde) et d'un seul gène β sur le chromosome 11 (2 gènes par génome diploïde).

Au total, le système de régulation de l'expression des gènes globine doit obéir à trois impératifs :

1. assurer l'expression tissulaire spécifiquement dans la lignée érythroïde
2. diriger l'expression séquentielle des gènes au cours du développement
3. maintenir l'équilibre d'expression α /non- α) égal à 1

Il s'agit essentiellement d'une régulation transcriptionnelle impliquant un ensemble complexe de facteurs protéiques de transcription interagissant entre eux et se fixant sur les régions régulatrices proximales (régions promotrices en amont de chacun des gènes) et de régions de régulation distales (LCR, *regulatory locus control region* en amont de la famille des gènes β et HS-40 en amont de la famille des gènes α) (**Figure 4**).

Parmi ces facteurs, deux sont plus pertinents à notre travail : le facteur BCL11A est un inhibiteur de l'expression des gènes de globine fœtale au stade adulte et donc le « chef d'orchestre » de la commutation fœtale/adulte et le facteur MYB, modulateur de ces interactions.

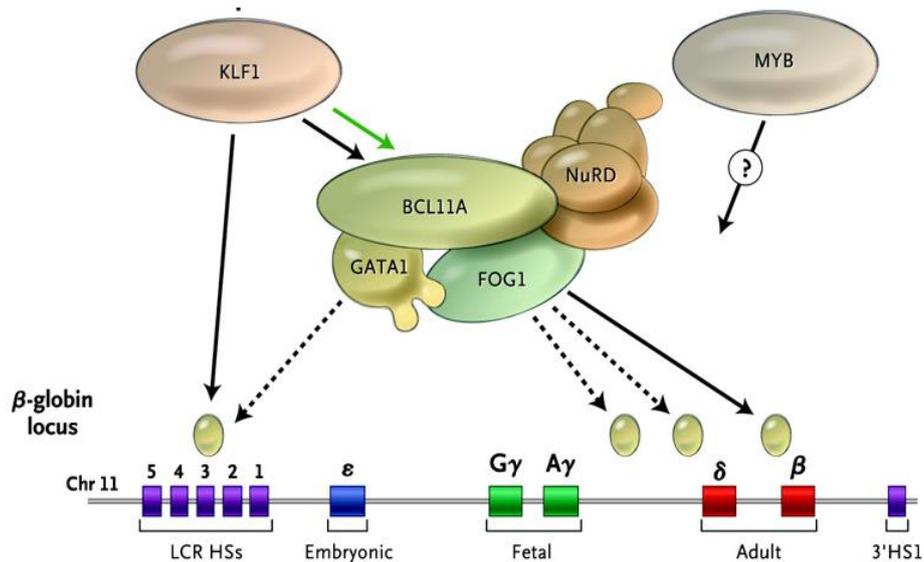


Figure 4 : Schéma simplifié de la régulation transcriptionnelle des gènes globine. Différents facteurs de transcription interagissent entre eux (interactions protéine/protéine) pour former des complexes multimoléculaires, lesquels agissent en se fixant sur les régions régulatrices des gènes (interactions protéine/ADN) (Sankaran et al., 2009; Xu et al., 2010).

1.3 Fonctions de l'hémoglobine

La fonction essentielle de l'hémoglobine est d'assurer le transport de l' O_2 des poumons aux tissus. Comme déjà indiqué, l' O_2 se fixe au niveau de la poche de l'hème sur chaque sous-unité et très précisément par une liaison de coordinence avec le Fer de l'hème d'un côté et avec une histidine (HisE7) de la chaîne de globine de l'autre. La fixation ne peut se faire que si le Fer est dans son état ferreux Fe^{2+} . L'Hb fixe l' O_2 selon un mécanisme allostérique dans lequel la molécule existe sous 2 conformations. La forme oxygénée (oxy-Hb) correspond à la forme R relâchée du modèle allostérique et possède une forte affinité pour l' O_2 ; la forme désoxygénée désoxy-Hb correspond à la forme T tendue et possède une faible affinité pour l' O_2 . Le caractère allostérique du mécanisme est essentiel pour assurer le rôle de transporteur d' O_2 , c'est-à-dire sa bonne fixation au niveau des poumons et sa bonne libération au niveau des tissus. En effet, l' O_2 est lui-même un effecteur allostérique de sa propre fixation (effet homotrope positif). C'est-à-dire qu'à fortes concentration d' O_2 (pO_2 élevée au niveau des poumons), toute molécule d' O_2 qui se fixe sur l'hémoglobine la stabilise dans la forme oxy-Hb à forte affinité et favorise ainsi

la fixation d'autres molécule d'O₂. A l'inverse, en conditions d'hypoxie au niveau des tissus (pO₂ faible), toute molécule d'O₂ qui se libère favorise la transition vers la forme désoxy-Hb à basse affinité, la stabilise et favorise la libération d'autres molécule d'O₂. Deux régulateurs allostériques adaptent de façon très fine la fonction de transport de l'O₂ en fonction des conditions physiologiques et physiopathologiques : les ions H⁺ (effet du pH = effet Bohr) et le 2,3-BPG. Ces deux régulateurs se fixent sur la forme T de la molécule d'Hb et la stabilisent. Tous les deux diminuent donc l'affinité de l'hémoglobine pour l'O₂ et favorisent sa libération au niveau des tissus. Le 2,3-BPG est un produit direct de la glycolyse par une dérivation propre au globule rouge (GR), le shunt de Rapoport-Lübering. Il est mis en jeu à moyen terme, lorsque, dans les situations d'hypoxie, la glycolyse anaérobie au sein du GR est favorisée, entraînant, une augmentation de la concentration intra-globulaire en 2,3-BPG et rétablissant une libération périphérique adéquate d'O₂.

A côté du rôle principal de transport de l'oxygène, l'hémoglobine possède également deux rôles secondaires de transporteur de CO₂ et de transporteur de monoxyde d'azote NO. Dans les cellules, le métabolisme oxydatif énergétique utilise de l'O₂ et produit du CO₂.

L'hémoglobine participe en partie au transport du CO₂ des tissus aux poumons. Celui-ci se fixe par des liaisons covalentes mais réversibles sur des groupements -NH₂ de la globine dont les groupements α-NH₂ de chaque chaîne. Cependant, la majorité du CO₂ est transportée dans le plasma sous forme de bicarbonates solubles.

Le NO est un puissant agent vasodilatateur produit par les cellules endothéliales (voir plus loin chapitre 1.3.3.1). Dans les conditions normales, une fraction du NO est capable d'atteindre le GR par diffusion. Il se fixe alors à l'hémoglobine par une liaison covalente mais réversible sur la Cys 93 des chaînes β-globine. Cette liaison ne s'établit que sur la forme R (oxy-Hb) donc dans des conditions oxygénées. Arrivée dans les tissus, l'hémoglobine relargue l'O₂ passe en configuration désoxy (forme T) et le NO s'en détache. Il est libre alors de diffuser dans le

vaisseau et d'exercer une action vasodilatatrice. Il s'agit là d'un système très élégant couplé au transport de l'O₂ dans lequel l'hémoglobine transporte également le NO, le libère dans la microcirculation et participe par l'effet vasodilatateur de ce dernier à un flux sanguin optimal et donc à un apport d'O₂ maximal dans les régions hypoxiques.

1.4 Les hémoglobinopathies

Les anomalies de l'hémoglobine (hémoglobinopathies) sont classées en deux catégories.

1.4.1 Les anomalies qualitatives

Elles correspondent aux variants de l'hémoglobine. On en dénombre à ce jour plus de 1300 (<http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar>). Ils correspondent à une substitution en acide aminé sur l'une ou l'autre des chaînes de globine. Les variants fréquents sont l'HbS, responsable de la drépanocytose, l'HbC et l'HbE (décrits plus loin, chapitre 2.1.2.1). Les autres variants sont rares. Parmi eux, la majorité correspond à des variants silencieux, simples polymorphismes neutres, n'altérant pas la fonction de l'hémoglobine. Une minorité de variants très rares ont une expression clinique car ils affectent des régions fonctionnelles importantes de la molécule (**Figure 5**).

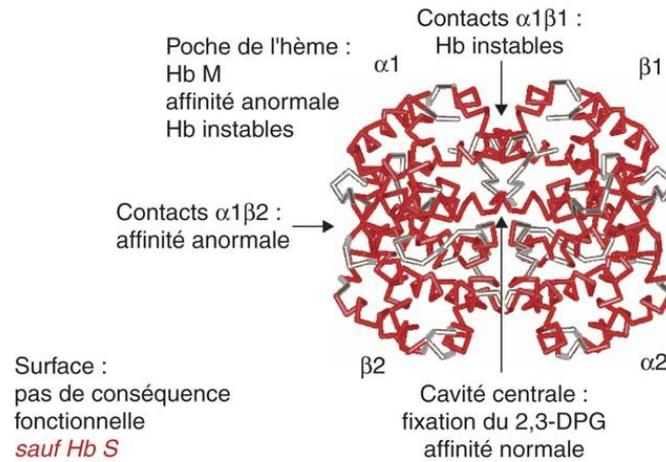


Figure 5 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine adulte (HbA). Le tétramère $\alpha_2\beta_2$ est une molécule globulaire. Les régions fonctionnellement importantes sont indiquées ainsi que les conséquences physiopathologiques des différents variants selon la localisation de la mutation dans la molécule (Labie et al., 2006).

Les substitutions affectant la poche de l'hème ou celle du 2,3BPG ou encore les contacts lâches ($\alpha_1\beta_2/\alpha_2\beta_1$) impliqués dans la transition allostérique entraînent des anomalies de l'affinité de l'hémoglobine pour l' O_2 . Les hémoglobines hyper-affines relarguent moins bien l' O_2 au niveau des tissus. Pour compenser, se développe une polyglobulie dont la sévérité est parallèle à l'augmentation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Les hémoglobines hypo-affines au contraire relarguent mieux l' O_2 au niveau des tissus et n'ont donc pas de conséquence pathologique. Elles peuvent être complètement silencieuses cliniquement ou s'accompagner d'une anémie et/ou une cyanose, car le sang veineux est très désaturé. Les substitutions affectant les contacts serrés ($\alpha_1\beta_1/\alpha_2\beta_2$) altèrent la stabilité du tétramère et correspondent à des hémoglobines instables précipitant dans le GR, le fragilisant et entraînant une anémie hémolytique. C'est le cas aussi de certaines substitutions au niveau de la poche de l'hème qui entraînent une perte d'hème. Enfin d'autres substitutions de la poche de l'hème entraînent l'oxydation du fer en Fe^{3+} . C'est le groupe des HbM impropres au transport de l' O_2 .

1.4.2 Les anomalies quantitatives

Elles résultent d'une altération de la production de l'une ou de l'autre des chaînes de globine. Ce groupe d'anomalies constitue les thalassémies (Couque et al., 2016). On en distingue deux types, les α thalassémies et les β thalassémies selon la chaîne dont la production est altérée. Au sein de chaque groupe on différencie aussi par exemple les β^0 thalassémies et les β^+ thalassémies selon que le défaut de production est complet ou partiel ; de même pour les α^0 et α^+ thalassémies. Les défauts moléculaires responsables des β thalassémies au niveau de l'ADN sont le plus souvent des substitutions de nucléotide unique, affectant les différentes étapes de l'expression des gènes (transcription, maturation des ARNm précurseurs ou apparition d'un codon stop) et rarement des délétions. Pour les α thalassémies, c'est l'inverse : les délétions sont les causes les plus communes et les substitutions de nucléotide unique sont rares. Dans tous les cas, le déterminant thalassémique entraîne un déséquilibre du rapport de production α/β et donc une accumulation d'une des chaînes de globine par rapport à celle insuffisamment produite. Le spectre clinique est extrêmement variable : du porteur sain aux formes incompatibles avec la vie (formes majeures d' α thalassémies). Dans tous les cas on observe biologiquement une microcytose et une diminution de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH). Cliniquement, on observe une anémie hémolytique dont la sévérité augmente avec l'augmentation du déséquilibre du rapport α/β .

2 La drépanocytose

2.1 Définition

2.1.1 La mutation β^S

La drépanocytose est une maladie génétique due à la substitution d'une adénine par une thymine au niveau du 20^{ème} nucléotide de l'ADNc correspondant au codon 7 dans l'exon 1 du gène de la β -globine (*HBB*) sur le chromosome 11. C'est la mutation β^S : (*HBB*) : c.[20A>T],

(p.Glu7Val) (Pauling et al., 1949). La drépanocytose est donc une maladie monogénique qui obéit à une transmission récessive autosomique. Au niveau protéique, la méthionine initiatrice a disparue et on observe le remplacement de l'acide glutamique par une valine en position 6 dans la β -globine mature (beta 6(A3) Glu>Val). Un sujet drépanocytaire est dit homozygote (SS) lorsqu'il hérite de l'allèle muté β^s de chacun des 2 parents. La signature cellulaire de la drépanocytose est l'observation de globules rouges en faucille (falciformés) qui lui a valu son nom anglais de *sickle cell disease* (*sickle* = faucille). La drépanocytose dans sa forme classique, se manifeste habituellement dès l'enfance et se caractérise par l'association d'une anémie chronique, de phénomènes vaso-occlusifs aigus dont le plus caractéristique est la crise vaso-occlusive douloureuse (CVO), et d'une susceptibilité extrême aux infections (Ware et al., 2017).

2.1.2 Hétérogénéité génétique des syndromes drépanocytaires majeurs (SDM)

Si la forme la plus commune de la drépanocytose est observée chez les homozygotes pour le gène β^s (patients SS), certains syndromes drépanocytaires majeurs (SDM) résultent d'hétérozygoties composites associant le gène β^s et un autre allèle anormal du gène β .

Les divers génotypes communs ou rares conduisant à un syndrome drépanocytaire majeur sont les suivants :

- homozygotie **SS**
- hétérozygoties composites
 - **SC**
 - **SE**
 - **SD^{Punjab}**, **SO^{Arab}**
 - **S β^o Thal**, **S β^+ Thal**
- rares variants dominants
 - **S^{Antilles}**, **S^{Oman}**

Souvent, l'HbS est associée à un autre variant commun ou semi-rare de l'hémoglobine (**Tableau 1**). Elle peut aussi être associée à un déterminant β^+ ou β° thalassémique. Les hétérozygotes composites S/ β^+ -thal présentent un SDM de sévérité modérée car ils expriment un peu d'HbA. Les hétérozygotes composites S/ β° -thal présentent un SDM aussi sévère que les homozygotes SS.

Nom	Hétérozygoties composites		
	Mutation (ADNc)	Substitution (aa, protéine)	Distribution
Variants communs			
HbC	HBB:c.19G>A	beta 6(A3) Glu>Lys	Afrique de l'Ouest (Plateau Voltaïque, Burkina Fasso)
HbE	HBB:c.79G>A	beta 26(B8) Glu>Lys	Asie du Sud-Est (Péninsule indochinoise)
Variants semi-rares			
HbD ^{Punjab}	HBB:c.364G>C	beta 121(GH4) Glu>Gln	Vallée de l'Indus, Punjab, Inde
HbO ^{Arab}	HBB:c.364G>A	beta 121(GH4) Glu>Lys	Balkans - Maghreb
Variants rares			
HbC ^{Ziguinchor}	HBB:c.[20A>T ; 176C>G]	beta6(A3)Glu>Val AND beta58(E2)Pro>Arg	Afrique de l'Ouest (Sénégal)
HbC ^{Harlem}	HBB:c.[20A>T ; 220G>A]	beta 6(A3) Glu>Val AND beta73(E17) Asp>Asn	Afrique de l'Ouest
HbS ^{Antilles}	HBB:c.[20A>T ; 70G>A]	beta6(A3)Glu>Val AND beta23(B5)Val>Ile	Antilles françaises
HbS ^{Oman}	HBB:c.[20A>T ; 364G>A]	beta6(A3)Glu>Val AND beta121(GH4)Glu>Lys	Sultanat d'Oman

Tableau 1. Variants communs, semi-rares ou rares (hors HbS) rencontrés dans le contexte des SDM (C. Lapoumériou, communication personnelle, données issues de <http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar>).

2.1.2.1 Les autres variants communs : HbC et HbE

L'HbC est le second variant pathologique de l'hémoglobine le plus fréquent en Afrique sub Saharienne, après l'HbS. Dans le contexte de notre étude africaine, elle est fréquemment retrouvée en association avec l'HbS car son épïcêtre est sur le plateau Voltaïque du Burkina Fasso (**Tableau 1**). Elle est donc très présente dans tous les pays entourant cette zone et au Mali où 45% des patients atteints de SDM sont des hétérozygotes composites SC. Elle résulte de la mutation HBB:c.19G>A, entraînant au niveau protéique le remplacement du même acide aminé que la drépanocytose en position 6 de la chaîne mais ici par une lysine hydrophile (β_6 Glu>Lys). Les patients homozygotes pour l'allèle β^C ont une présentation clinique discrète ; ils peuvent présenter une anémie hémolytique modérée, associée à une splénomégalie (Feeling-Taylor et

al., 2004). Par contre les hétérozygotes composites SC présente un SDM, qui néanmoins a tendance à être moins sévère que celui des patients SS.

L'HbE est au niveau mondial le 2^{ème} variant le plus fréquent après l'HbS. Mais sa distribution géographique est très différente : c'est le variant caractéristique du Sud-Est asiatique (**Tableau 1**). Les patients homozygotes pour l'allèle β^E ont une présentation clinico-biologique discrète avec une microcytose constante, mais une anémie absente ou très modérée. Par contre, les hétérozygotes composites E/ β -Thal fréquents dans la région présentent un syndrome thalassémique d'intensité variable mais pouvant être très sévère. Les hétérozygotes composites SE sont rares vu la répartition géographique très différente des deux variants, mais sont porteurs d'un SDM très modéré.

2.1.2.2 Variants semi-rares et rares

Le **Tableau 1** résume les principaux variants (or HbS) rencontrés dans le contexte des SDM. Les hétérozygoties composites SD^{Punjab} et SO^{Arab} sont des associations non exceptionnelles et se présentent comme des SDM sévères. Les premières sont surtout observées en Inde les secondes dans les Balkans et au Maghreb et les deux dans toutes les régions du monde à populations mélangées (États-Unis, Europe) (Knox-Macaulay et al., 2007; Orkin et al., 1982; Torres et al., 2015; Zimmerman et al., 1999).

Un groupe de variants rares, à localisation géographique restreinte, se caractérise par la présence de la mutation β^S et d'une seconde mutation en *cis* dans le même gène *HBB*. Ces allèles ont la même signification pathologique que le gène β^S dont ils portent la mutation HBB:c.(20A>T). On peut citer en particulier les HbC^{Ziguinchor} et HbC^{Harlem} observées en Afrique de l'Ouest, l'HbS^{Antilles} et l'HbS^{Oman}. Ces deux derniers variants ont la particularité de présenter une transmission dominante, c'est-à-dire qu'ils s'expriment chez les sujets hétérozygotes (Quinn, 2016; Thein, 2018).

2.2 Grandes dates dans l'histoire de la drépanocytose

2.2.1 Description clinique

En 1910, le Dr James B Herrick publie en Amérique du Nord la première description clinique de la drépanocytose, chez un patient antillais (Herrick, 1910). Cependant, la maladie était déjà bien connue dans ses manifestations en Afrique et sous plusieurs appellations. Ces appellations renvoyaient toutes, à la notion de douleur : koloci en pays mandé (Mali), kulu-kulu en langue fon et yoruba (Bénin, Togo, Nigéria), celimpolo en myéné (Gabon), etc... La plupart cependant ne sont pas spécifiques et peuvent englober les douleurs arthritiques liées à l'âge autant que certaines pathologies chroniques ressenties au niveau des os.

2.2.2 Description biologique

Victor E Emmel en 1917, observe le phénomène de falciformation chimiquement induite chez le père d'un enfant atteint et suggère une base génétique à la maladie (Emmel, 1917). En 1927, Verno Hahn et Elisabeth Gillespie découvrent le phénomène de falciformation en hypoxie et son caractère irréversible (Hahn et al., 1927). Hale Hamm et Willaim Castle en 1940, rapportent la relation entre la falciformation et l'hyperviscosité sanguine (Ham et al., 1940). En utilisant la technique d'électrophorèse en veine liquide, en 1949, Linus Pauling met en évidence la présence d'HbS chez les patients drépanocytaires et utilise pour la première fois le terminologie de « maladie moléculaire » (Pauling et al., 1949). La substitution $\beta^{\text{Glu-Val}}$ est découverte en 1956 par Veron Ingram (Ingram, 1956). Enfin l'année 1960 est marquée par la description de la structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine par Max Perutz (Perutz et al., 1960).

2.2.3 Prise en charge

La maladie sort de l'ombre dans les années 1960 - 1980 lors de mouvements noirs revendiquant les droits civiques. C'est Fred Hampton, un Black Panther (assassiné en 1969) qui met en place

le premier centre de prise en charge des drépanocytaires et de dépistage de la maladie (Cook Country Hospital, Chicago). En 1986, Marilyn Gaston démontre l'impact positif de la prophylaxie par pénicilline orale chez les enfants drépanocytaires (Gaston et al., 1986). C'est aussi le début des grandes recherches en thérapeutique en particulier recherche d'inhibiteurs de la polymérisation de la désoxyHbS (1985), mais qui n'aboutiront jamais à des drogues utilisables chez les patients (au moins jusqu'à très récemment (Votano et al., 1985) ; première avancée décisive : stimulation de la synthèse de l'hémoglobine fœtale par l'hydroxycarbamide (1995) (Charache et al., 1995) ; 1^{ère} greffe de moelle osseuse (1990) (Lucarelli et al., 1990) et la même année, création des premiers modèles animaux transgéniques; thérapie génique (1^{er} essai en 2007) (Cavazzana-Calvo et al., 2010; Nienhuis, 2008). Les années 2000 sont marquées par le début d'une reconnaissance internationale de la drépanocytose. Ainsi, la drépanocytose est déclarée comme priorité de santé publique au monde par l'Union Africaine en 2005 (<https://archives.au.int/handle/123456789/218>), l'UNESCO puis l'OMS en 2006 (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/1727>) et les Nations Unies en 2008 (<https://www.un.org/press/en/2008/ga10803.doc.htm>). Plusieurs programmes de dépistage néonatal sont développés, à titre expérimental, aux Etats-Unis, en Angleterre, aux Antilles française à partir de 1981 et en France Métropolitaine : à Marseille en 1985, en Ile de France et à Lille en 1987. La généralisation du dépistage néonatal à l'ensemble des territoires nationaux a été établie en France et au Royaume Uni en 2000, en 2006 aux États-Unis, en 2007 aux Pays-Bas, 2013 au Brésil et en 2015 en Espagne (Daniel et al., 2019; El-Haj et al., 2018; Silva-Pinto et al., 2019). Les premiers programmes pilotes de dépistage en Afrique sub-Saharienne ont été mis en place en 1993 à Cotonou (Bénin) et à Kumassi (Ghana) (Ohene-Frempong et al., 2008; Rahimy et al., 2009). Depuis, les projets pilotes se sont développés dans beaucoup de pays africains (principalement dans les capitales) et en Inde. Mais à ce stade aucun programme exhaustif de dépistage national systématique n'est en place (Therrell et al., 2020).

2.2.4 La drépanocytose aujourd'hui

La distribution actuelle du gène β^s résulte à la fois d'un processus naturel de sélection biologique et de l'histoire des migrations humaines. Présent depuis au moins sept mille ans en Afrique subsaharienne et en Inde, il s'est maintenu car il confère aux porteurs sains (hétérozygotes A/S) un avantage sélectif en les protégeant contre les formes graves de paludisme à *Plasmodium falciparum* (neuro-paludisme) (Allison, 1954) présent dans ces régions du monde (Beutler et al., 1955; Hebbel et al., 2003; Lell et al., 2018). Puis l'allèle β^s s'est répandu d'abord en Méditerranée et au Moyen-Orient le long des voies commerciales trans-sahariennes et maritimes, incluant la traite orientale d'esclaves africains. Puis, à partir du XVI^{ème} siècle des millions d'africains ont été déportés vers le continent américain et les Caraïbes lors des traites négrières transatlantiques. Enfin, à partir des années 1960 nous assistons à des migrations économiques et/ou résultant de conflits essentiellement vers l'Europe. A l'heure actuelle, le gène β^s est présent dans 5% de la population mondiale. On estime que plus de 300 000 nouveau-nés affectés par la drépanocytose naissent chaque année (Piel et al., 2013). Plus de 85% de ces enfants se trouvent dans des pays à faible revenu économique, avec une mortalité avant l'âge de 5 ans estimée en Afrique sub-Saharienne à 80% en zone rurale et à 50% en zone urbaine (Rapport OMS (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/1727>)). En Afrique, les taux de prévalence les plus élevés du trait drépanocytaire (c'est-à-dire le fait d'être hétérozygote AS) sont enregistrés entre le 15^{ème} parallèle nord et le 20^{ème} parallèle sud, atteignant entre 10 et 40% de la population dans certaines régions. Dans des pays comme le Cameroun, la République du Congo, le Gabon, le Ghana et le Nigéria, les taux de prévalence varient entre 20 et 30%, tandis que dans certaines régions de l'Ouganda, ils peuvent atteindre 45%. Dans les pays où la prévalence du trait drépanocytaire est supérieure à 20%, la maladie affecte environ 2% de la population.

Enfin il est à noter que les pays les plus atteints sont également les pays où la croissance démographique est la plus importante. Les projections actuelles prédisent que l'Inde actuellement 2^{ème} pays le plus peuplé après la Chine devrait se placer en 1^{ère} position en 2027 et atteindre une population de 1,7 milliards d'habitants en 2050 (17% de la population mondiale). Pendant la même période, la population de l'Afrique devrait doubler pour passer de 1,3 milliards à 2,5 en 2050 (soit de 17 à 26% de la population mondiale), avec les progressions les plus fortes au Nigéria qui devrait devenir le 3^{ème} pays le plus peuplé au monde, en République Démocratique du Congo, en Éthiopie, Tanzanie et Ouganda. En comparaison, la population européenne devrait stagner sur cette même période et celle des États-Unis augmenter de 20% ([Source: World Population Prospects 2019 https://population.un.org/wpp/](https://population.un.org/wpp/)). En ce qui concerne la drépanocytose, l'équipe de Piel a réalisé une projection de la variation de son incidence entre 2010 et 2050 dans les différents pays. Leurs résultats sont schématisés dans les cartogrammes présentés dans la **Figure 6** (Piel et al., 2013).

Au niveau mondial, le modèle prédit une augmentation de l'incidence de 30% et atteindre 405 000 malades en 2050. Sans intervention, le Nigeria devrait observer une augmentation du nombre de nouveaux nés de 60% (141 000 en 2050) et la République Démocratique du Congo de 13% (45 000 en 2050). La mise en place de programmes massifs de dépistage néonatal et d'une prise en charge précoce devrait sauver la vie de presque 10 millions d'enfants en 2050 par une réduction drastique de la mortalité avant 5 ans. Même si une incertitude certaine pèse ce modèle prédictif, les chiffres sont saisissants et l'action est de mise.

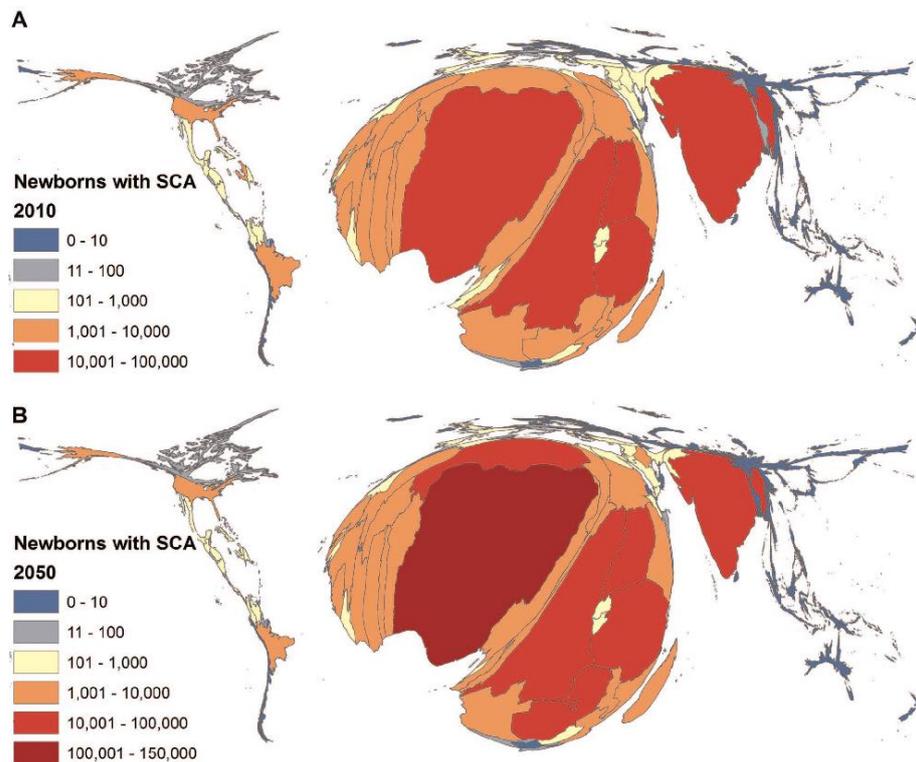


Figure 6 : Cartogramme des estimations du nombre de nouveau-nés drépanocytaires par pays : estimations en 2010 (A), estimations pour 2050 (B). Les cartes ont été redessinées de façon à ce que la surface représentée pour chaque pays ne soit plus la surface physique, mais qu'elle soit proportionnelle à l'incidence de la drépanocytose (Piel et al., 2013).

Au Mali, les différentes études réalisées situent la fréquence du trait drépanocytairé autour de 12% avec des fréquences variables du nord au sud allant de 6,1% pour les régions du nord pour atteindre 15 à 20% dans certaines régions du sud. Le criblage néonatal estime le nombre de naissances d'enfants drépanocytaires entre 5 000 à 6 000 par an (Diallo, 2013).

En Europe, la maladie est à la fois endogène par exemple en Italie du Sud, en Grèce et au Portugal, affectant des patients de phénotype caucasien, mais majoritairement exogène affectant des populations migrantes originaires d'Afrique sub-saharienne et du Moyen-Orient et des populations Caribéennes. Le nombre de patients avoisinerait les 40 000, essentiellement répartis entre la France et le Royaume Uni (Daniel et al., 2019). Dans ces deux pays, l'incidence est de 1/2000 à 1/1800 naissances, mais avec une distribution hétérogène et une concentration particulière dans les grandes métropoles (Paris – incidence : 1/800, Marseille, Londres ou

Birmingham). A titre de comparaison, le nombre de patients aux États-Unis est aux alentours de 85 000 avec une prévalence de 1/1900 naissances. Le nombre de patients au Brésil et dans les Caraïbes n'est pas connu, mais la prévalence est de 1/1000 naissances au Brésil et de 1/420 dans les Antilles françaises.

1.3 Physiopathologie de la drépanocytose

Bien que la mutation à l'origine de la drépanocytose concerne l'hémoglobine, protéine dont l'expression est restreinte au lignage érythrocytaire, de nombreuses études publiées ces dernières décades montrent que l'ensemble du système vasculaire, cellules circulantes et endothélium vasculaire, est impliqué dans le mécanisme physiopathologique et la survenue des complications (Allali et al., 2020; Hebbel et al., 2004). L'endothélium vasculaire est un régulateur clé de l'homéostasie vasculaire. Dans des conditions d'activation et de stress, il va exprimer des protéines membranaires et solubles et des petites molécules impliquées dans les phénomènes d'adhérence cellulaire, d'inflammation, de coagulation et de régulation du tonus vasculaire (Hebbel et al., 2004). Les cycles d'ischémie-reperfusion qui caractérisent la drépanocytose provoquent des altérations de l'endothélium, l'expression de molécules d'adhérence, de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, de facteurs pro-thrombotiques et la libération de radicaux libres entraînant des dommages cellulaires et tissulaires (Ansari & Gavins, 2019). L'ensemble participe notamment au recrutement des cellules circulantes au site d'intérêt, à leur activation, à des interactions intercellulaires complexes et des phénomènes anormaux d'adhérence ainsi qu'à une dysrégulation du tonus vasculaire (Allali et al., 2020; Telen, 2007). L'hémolyse est également un facteur essentiel dans la physiopathologie de la drépanocytose. L'organisme dispose de moyens naturels de défense contre les conséquences de l'hémolyse : l'hémoglobine libérée est complexée par l'haptoglobine, puis ciblée sur les macrophages où le complexe est absorbé par endocytose et dégradé. De même, l'hème libre

dans le plasma est soit lié par l'hémopexine, soit immédiatement dégradé en monoxyde de carbone et biliverdine par l'hème oxygénase-1 (HO-1) et le Fer libéré. Cependant, lorsque l'hémolyse est trop importante, comme dans la drépanocytose, ces mécanismes sont saturés résultant en la présence d'hémoglobine et d'hème libres dans le plasma. La physiopathologie de la drépanocytose associe donc plusieurs phénomènes incluant le mécanisme initiateur (polymérisation de la désoxy-HbS), ses conséquences au niveau de la membrane cellulaire et la déshydratation des GR, l'hémolyse avec le rôle délétère de l'hémoglobine et de l'hème libres responsables d'une activation des mécanismes de l'inflammation et des phénomènes anormaux d'adhérence cellulaire, une dysfonction endothéliale et des phénomènes inflammatoires (**Figure 7**). Ces phénomènes seront décrits de manière séquentielle mais ils interviennent de façon intriquée et dynamique impliquant un ensemble complexe d'interactions et de coopérations cellulaires et moléculaires.

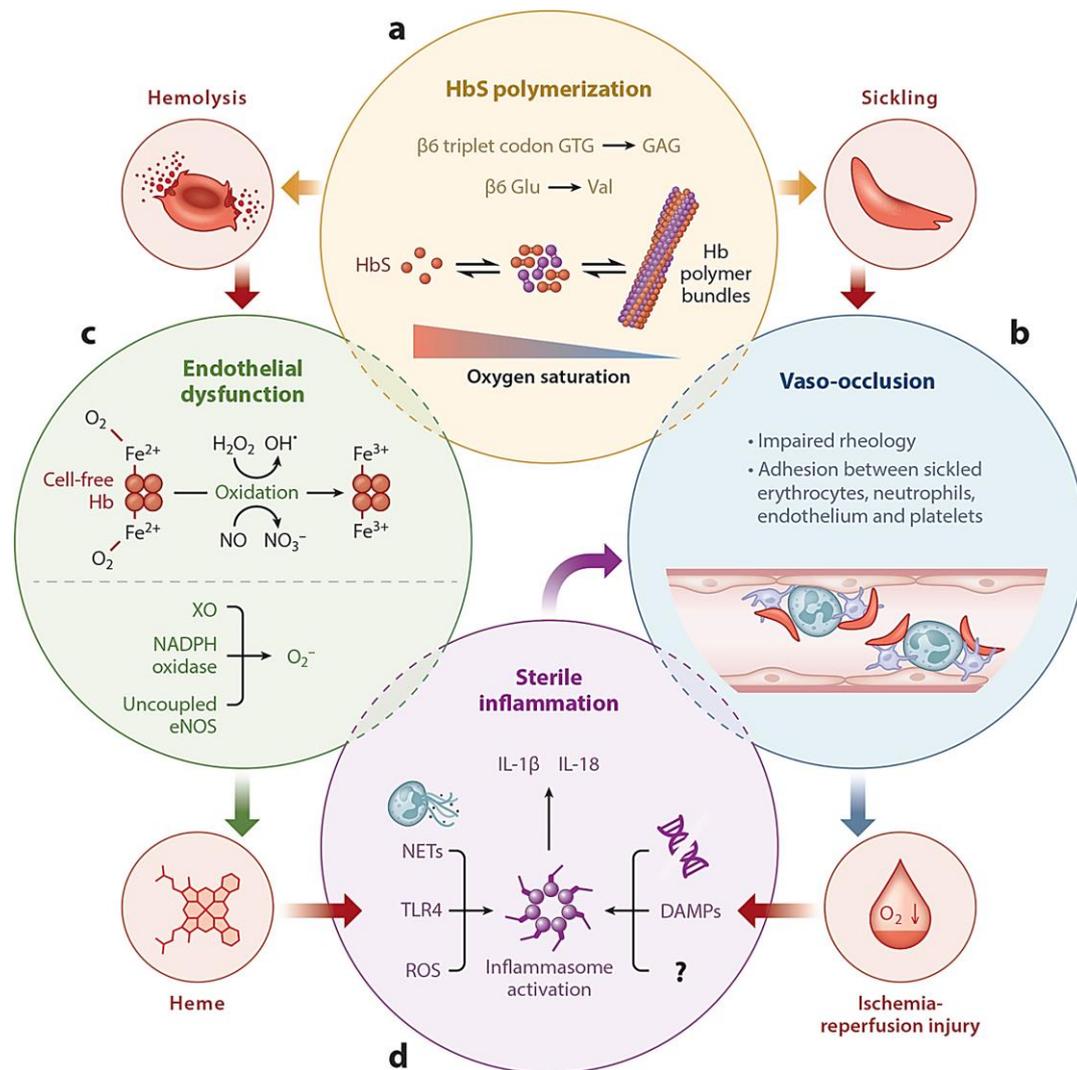


Figure 7 : Physiopathologie moléculaire de la drépanocytose. **(a)** la substitution Glu-Val est à l'origine d'une HbS capable de polymériser dans sa forme désoxygénée lorsque la pression partielle en O₂ baisse et entraînant la falciformation du GR. **(b)** L'altération de la rhéologie associée à l'agrégation des globules rouges, des polynucléaires neutrophiles, des cellules endothéliales et les plaquettes sanguines entraînent une occlusion vasculaire à l'origine de lésions d'ischémie/reperfusion. **(c)** La polymérisation induit également une hémolyse libérant de l'Hb libre générant des radicaux libres de l'O₂, responsables d'une activation endothéliale et d'un stimulus vasoconstricteur par l'invalidation fonctionnelle du NO (agent vasodilatateur). **(d)** L'hème libre et les lésions d'ischémie/reperfusion entraînent une inflammation stérile par l'intermédiaire des radicaux oxydants, de l'activation de TLR4 (*Toll like receptor 4*), de la génération de DAMP érythrocytaires (*damage-associated molecular pattern*) à l'origine de la synthèse de cytokines inflammatoires qui, en retour, aggravent l'adhérence cellulaire (Sundd et al., 2019).

1.3.1 Polymérisation de l'hémoglobine S

1.3.1.1 Mécanisme de la polymérisation

Le phénomène de falciformation des GR est la conséquence de la polymérisation de l'HbS (**Figure 7a**). Celle-ci résulte de la nature de la substitution en acide aminée caractéristique de l'HbS où un acide glutamique hydrophile est remplacée par une valine hydrophobe en position 6 dans la chaîne de β -globine. En conformation désoxygénée (désoxy-HbS), des interactions hydrophobes s'établissent entre les chaînes- β de deux tétramères normalement indépendants. La valine 6 sur la chaîne- β du 1^{er} tétramère établit des interactions avec deux résidus hydrophobes (leucine 89 et phénylalanine 86) sur la chaîne β du 2^{ème} tétramère. Ce type d'interaction se propage ensuite à d'autres tétramères et le phénomène de polymérisation est initié (**Figure 8**). Dans un processus autocatalytique, nécessitant un certain temps de latence les polymères s'associent de façon ordonnée et homogène pour aboutir à la formation de fibres de plus en plus longues jusqu'à repousser et endommager la membrane du GR. Il en résulte 1. une déformation des GR (classiquement en faucille), 2. une rigidification cellulaire et 3. une fragilisation de la membrane. A l'état basal (en dehors de tout stress), le temps de passage du GR dans la microcirculation (en conditions hypoxiques) est inférieur au temps de latence de sorte que le phénomène de polymérisation de la désoxy-HbS n'atteint pas sa complétion. Revenu dans la circulation oxygénée, la polymérisation est réversible. Cependant, les cycles répétés d'oxygénation/désoxygénation, à chaque cycle circulatoire, conduisent à l'accumulation des dommages membranaires et à la formation de drépanocytes irréversibles lorsque ceux-ci deviennent irréparables.

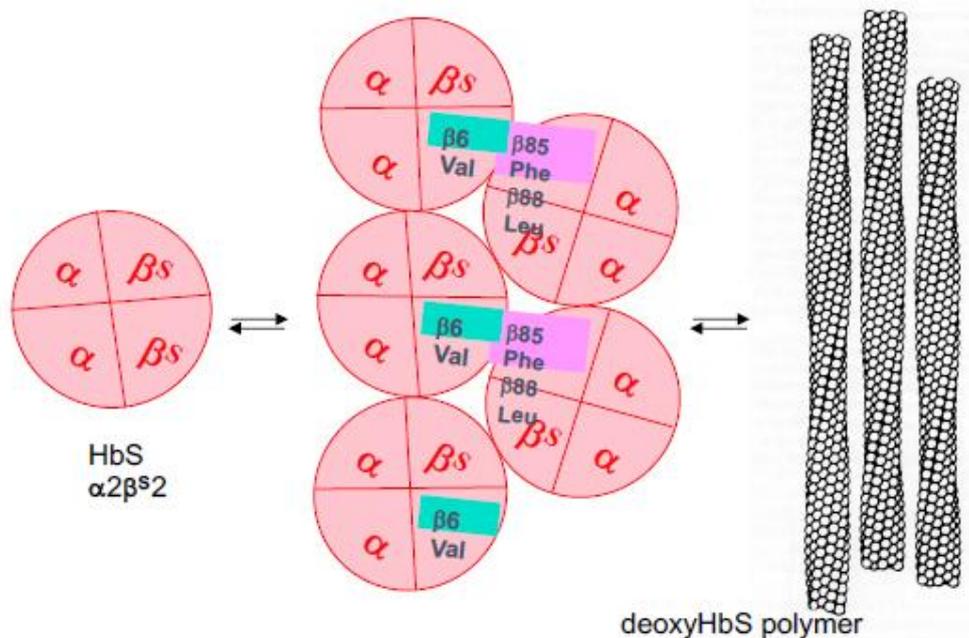


Figure 8: Polymérisation de l'HbS. Polymérisation de l'Hb S en condition hypoxique avec formation de longues fibres rigides ordonnées qui repoussent la membrane érythrocytaire et en altèrent les propriétés (Elion & Labie, 1996).

1.3.1.2 Facteurs modulant la polymérisation de l'HbS

Il existe plusieurs facteurs pouvant moduler la polymérisation de l'hémoglobine S, parmi lesquels des variations de l'affinité de l'Hb pour l'O₂ et la concentration intra-cellulaire en HbS.

Variations de l'affinité de l'Hb pour l'O₂ :

Dans la drépanocytose, les phases hypoxiques des phénomènes d'ischémie/reperfusion activent la glycolyse anaérobie. Ce mécanisme compensatoire augmente la concentration intra-globulaire en 2,3-BPG, l'affinité des GR pour l'O₂ est basse et son apport périphérique amélioré (Charache et al., 1970). Dans ce cas cependant, il s'agit d'un cercle vicieux puisque la désoxy-HbS (forme T) est favorisée et que c'est elle qui polymérise. En conséquence, être à même de moduler pharmacologiquement l'affinité de l'HbS pour l'O₂ en faveur de la forme R (oxy-HbS) serait susceptible diminuer la polymérisation de l'HbS et donc constituer une cible thérapeutique intéressante.

Concentration intra-érythrocytaire en HbS :

La polymérisation de l'HbS, et plus précisément le temps de latence avant polymérisation, est corrélée de façon exponentielle à la concentration en HbS à l'intérieur du GR (Ferrone, 2015). Le phénomène de déshydratation cellulaire, décrit plus bas, constitue un cercle vicieux qui va provoquer une augmentation de la concentration intra érythrocytaire en HbS qui favorise le contact entre les différentes molécules et donc la polymérisation (H. F. Bunn, 1997). A l'inverse, deux situations sont susceptibles de diminuer la concentration intra érythrocytaire en HbS et donc le phénomène de polymérisation. Premièrement, dans l' α -thalassémie (Embury et al., 1984), on observe une diminution de la concentration corpusculaire d'hémoglobine en général, ici l'HbS, deuxièmement, la persistance d'hémoglobine fœtale (HbF) dans le GR « dilue » l'HbS et donc diminue sa concentration relative intra érythrocytaire (Akinsheye et al., 2011). Ces deux conditions constituent des facteurs d'atténuation de la maladie. Augmenter pharmacologiquement ou par des interventions génétiques le taux d'HbF est une cible thérapeutique privilégiée objet d'intenses recherches.

1.3.2 Conséquences fonctionnelles de la polymérisation au niveau érythrocytaire

Tel qu'évoqué plus haut, les cycles de falciformation/défalciformation provoquent des altérations multiples du GR drépanocytaire conduisant à une déshydratation cellulaire, à des anomalies membranaires et fonctionnelles et à une grande hétérogénéité cellulaire des GR drépanocytaires.

1.3.2.1 Déshydratation cellulaire

La polymérisation de l'HbS induit des altérations membranaires responsables d'une augmentation de la perméabilité membranaire érythrocytaire, une perte de potassium K^+ et une entrée de sodium Na^+ dans la cellule (Tosteson et al., 1952). Ce phénomène de perméabilité,

appelé P sickle, est spécifique aux GR drépanocytaires. L'augmentation de perméabilité induit également une entrée massive de Ca^{2+} , dont la conséquence est l'activation des canaux Gardos avec fuite de K^+ et d'eau vers le compartiment extra-cellulaire (Gárdos, 1958; McGoron et al., 2000). La déshydratation provoque alors une acidification du GR qui permet l'ouverture du co-transporteur KCl (Brugnara et al., 1987; Brugnara et al., 1989). Les ions K^+ et Cl^- s'échappent des GR, associés à des molécules d'eau, ce qui accentue encore la déshydratation cellulaire et favorise donc la polymérisation de l'HbS (Brugnara, 2018). Essayer de prévenir la déshydratation cellulaire dans un but thérapeutique en inhibant le co-transporteur KCl (Mg-pidolate) (De Franceschi et al., 1997) ou le canal Gardos (Clotrimazole, Senicapoc) a été l'objet d'une recherche intensive, malheureusement sans résultats probants à ce jour (Ataga et al., 2011; Stocker et al., 2003).

1.3.2.2 Hétérogénéité cellulaire des GR drépanocytaires

Du fait du stress anémique et de la régénération accrue des GR et consécutivement aux cycles de falciformation et à la déshydratation cellulaire les GR de patients drépanocytaires sont composés de sous-populations de densité très variables contrairement aux GR de contrôles sains (**Figure 9**) (Fabry et al., 1982). Il existe plusieurs fractions cellulaires qui se distinguent selon leur densité. Une sous-population très peu dense correspond aux réticulocytes. Ces cellules jeunes, hydratées et déformables jouent un rôle important dans les phénomènes d'adhérence anormale à l'endothélium décrits plus bas. A l'opposé, on observe des cellules denses, définies comme ayant une densité supérieure à 1,12 g/mL d'hémoglobine corpusculaire (Fabry et al., 1982). Les GR denses sont rigides et instables et reflètent ainsi le pourcentage de cellules falciformes irréversibles. De par l'altération de leur déformabilité, ces cellules peuvent difficilement établir des points de contact avec l'endothélium vasculaire mais elles sont en revanche très sensibles à l'hémolyse intra vasculaire (Bartolucci et al., 2012; Messmann et al.,

1990). Le pourcentage de cellules denses est associé aux paramètres biologiques de l'hémolyse (LDH, bilirubine et pourcentage de réticulocytes) et aux complications cliniques.

La diminution de la déformabilité érythrocytaire, participe aussi aux altérations hémorhéologiques globales observées dans la drépanocytose telles que l'augmentation de la viscosité sanguine (Nader et al., 2019). Elle exerce un effet paradoxal sur l'agrégabilité érythrocytaire. En effet si la rigidité cellulaire diminue, l'agrégabilité et la formation de rouleaux d'hématies diminue aussi la désagrégation des rouleaux et exerce un effet global délétère.

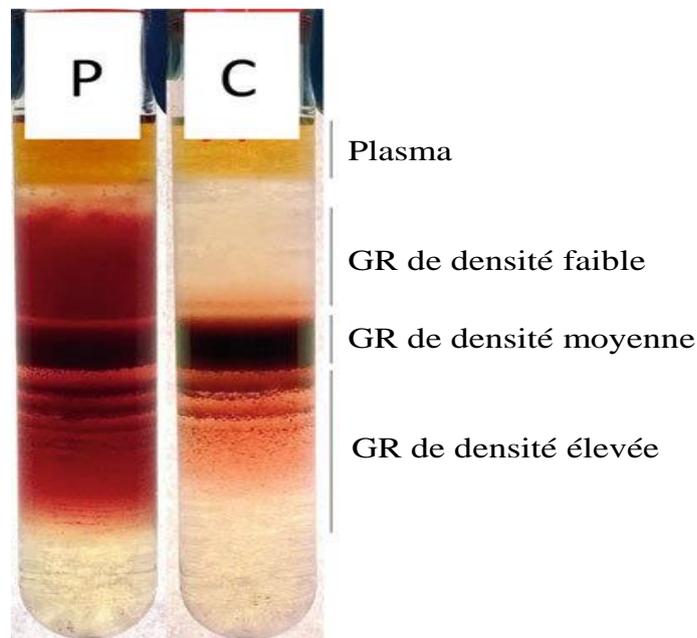


Figure 9 : Distribution des globules rouges (GR) dans un gradient de Percoll montrant les fractions cellulaires de densité faible, moyenne et élevée dans un échantillon sanguin d'un sujet sain C et d'un patient atteint de drépanocytose. P : patient, C : contrôle (Makhro et al., 2017).

1.3.2.2 Altérations de la membrane du GR

Au-delà des altérations des transports ioniques décrits plus haut, la falciformation conduit à une rigidification et une fragilisation de la membrane érythrocytaire. Elle engendre également l'expression et l'exposition de molécules d'adhérence à la surface du GR qui ne sont pas

exprimées ou exposées en conditions physiologiques. La phosphatidylsérine (PS), phospholipide du feuillet interne de la membrane plasmique, est externalisée. Les GR exposant la PS à leur surface jouent un rôle important dans l'activation endothéliale, les interactions avec les leucocytes et les plaquettes, et l'activation de la coagulation. Certaines molécules d'adhérence voient leur expression augmentée à la surface du GR drépanocytaire comme BCAM/Lu (*basal cell adhesion molecule/Lutheran*), l'IAP (*integrin associated protein*) ou CD47 et ICAM-4 (*intercellular adhesion molecule-4*) (Cartron & Elion, 2008; Telen, 2016). De plus, les cellules très jeunes, peu denses et les réticulocytes immatures relargués dans la circulation suite à l'érythropoïèse de stress expriment également à leur surface des molécules d'adhérence telles que CD36, l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ (aussi appelée very late antigen-4, VLA-4), et CD36 (Joneckis et al., 1993; Swerlick et al., 1993).

Enfin, les cycles de falciformation/defalciformation provoquent la libération de fragments cellulaires s'organisant en structure microvésiculée présentant à leur surface les mêmes anomalies de membrane que le GR dont elles sont issues. Il s'agit de ce que nous appelons maintenant les microparticules (Piccin et al., 2007; Westerman et al., 2008). Ces dernières ont été démontrées ne pas être seulement des marqueurs passifs des modifications cellulaires mais des acteurs actifs du processus pathogénique (voir chapitre suivant).

1.3.3 Mécanismes de la vaso-occlusion

Les phénomènes vaso-occlusifs observés chez les patients drépanocytaires provoquent une ischémie, principal facteur déclencheur des crises vaso-occlusives douloureuses. Leur déclenchement est la résultante d'interactions exacerbées entre des cellules circulantes entre elles et avec l'endothélium vasculaire et à l'existence de phénomènes d'adhérence anormale à l'endothélium (**Figure 7b**). Il en résulte une diminution locale du flux sanguin, une persistance prolongée de la présence des GR en un milieu hypooxygéné, une formation accrue de cellules falciformées, rigides et une obstruction vasculaire. Il en résulte des phénomènes

d'ischémie/reperfusion qui initie des réactions inflammatoires et auto-entretiennent un cercle vicieux pathogénique dans le contexte d'un important dysfonctionnement endothélial.

1.3.3.1 Interactions cellulaires et adhérence anormale à l'endothélium

Les phénomènes d'adhérence accrue ont été identifiés dans le milieu des années 80 par les groupes de R. Hebbel et de N. Mohandas (Barabino et al., 1987; Hebbel et al., 1980; Kaul et al., 1989; Mohandas et al., 1985; Montes et al., 2002). Ils font depuis l'objet de recherche intense afin d'identifier les acteurs moléculaires et cellulaires responsables de ces phénomènes. Le décryptage des interactions a permis la mise en place d'un schéma de plus en plus précis de la survenue de l'obstruction vasculaire. Sur les GR, les molécules impliquées sont les protéines d'adhérence citées plus haut. Certaines de ces molécules dont Lu/BCAM (présente aussi sur l'endothélium) doivent être activées par phosphorylation pour exprimer leur propriétés proadhésives. Plusieurs études réalisées dans les modèles murins transgéniques drépanocytaires montrent que des cycles expérimentaux d'hypoxie ou une stimulation par des molécules inflammatoires augmentent les interactions adhésives entre GR et endothélium dans les veinules postcapillaires, initiant ainsi les occlusions micro vasculaires. Une découverte importante a été faite dans le début des années 2000, la démonstration de la participation des polynucléaires neutrophiles à ce mécanisme (Belcher et al., 2005; Frenette, 2002). Il est clair maintenant que tous les éléments figurés du sang participent à ces cascades d'activation et d'interactions anormales entre elles et avec l'endothélium qui sont à la base de l'initiation de la vaso-occlusion (**Figure 10**). Y contribuent également des composants solubles plasmatiques tels que la fibronectine (FBN), les multimères de très haut poids moléculaire du Facteur de von Willebrand (ULvWF) et la thrombospondine (TSP). La compréhension fine de ces mécanismes est primordiale car l'utilisation thérapeutique de drogues antiadhésives est une voie prometteuse.

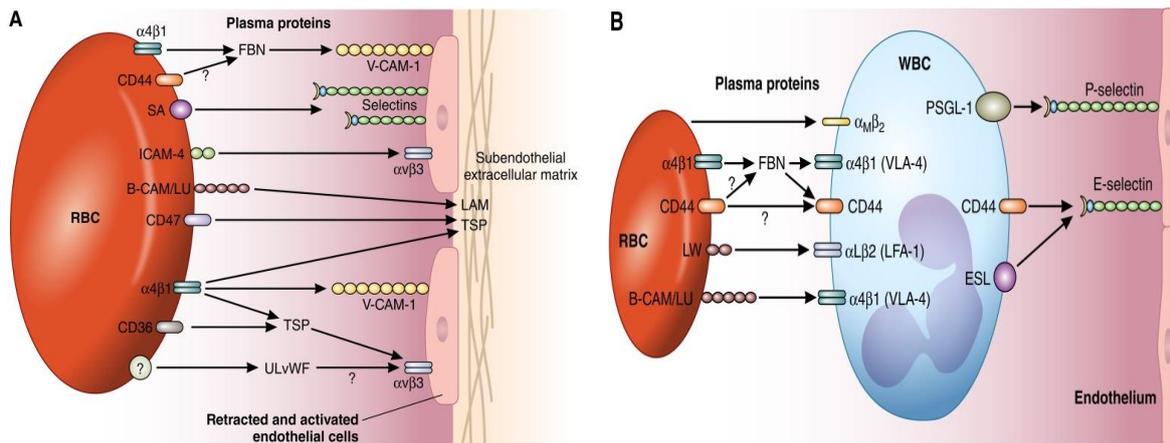


Figure 10 : Molécules de surface impliquées dans l'adhérence des globules rouges SS. (A) Interactions multiples entre les globules rouges SS et les cellules endothéliales, la matrice extracellulaire et les protéines plasmatiques. (B) Interactions entre les globules rouges SS et les leucocytes adhérant aux parois des vaisseaux. ULvWF, *ultra-large von Willebrand factor*, CD36 : *cluster of differentiation 36/platelet glycoprotein 4*, $\alpha_4\beta_1$: Intégrine $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4 *very late antigen-4*), $\alpha_v\beta_3$: $\alpha_v\beta_3$ intégrine, TSP : *thrombospondine*, V-CAM-1 : *vascular cell adhesion molecule 1*, CD47 : *integrin associated protein (IAP)*, B-CAM/LU : *basal cell adhesion molecule/Lutheran protein*, LAM : *laminines*, ICAM-4 : *intercellular adhesion molecule 4*, SA : *sialic acid*, FBN : *fibronectine*, LW : *Landsteiner Weiner blood group*, LFA-1 : *Lymphocyte function-associated antigen 1*, $\alpha_M\beta_2$: intégrine $\alpha_M\beta_2$, ESL-1, *E-selectin ligand-1*; PSGL-1, *P-selectin glycoprotein ligand-1* (Telen, 2016).

Ces interactions anormales ont lieu avec un endothélium activé. Plusieurs facteurs contribuent à l'activation de l'endothélium vasculaire parmi lesquels le contact avec les GR drépanocytaires, les produits de de l'hémolyse, essentiellement l'hème et l'hémoglobine en résultant et les espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen species*) résultant des cycles d'ischémie-reperfusion. Une fois activé l'endothélium va exprimer à sa surface (mais partiellement aussi sous forme soluble) les sélectines (P et E), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule -1*) et ICAM-1 (*inter cellular adhesion molecule*), et sécréter des chimio-attractants tels l'interleukine (IL-8) et des cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF α (*tumor necrosis factor α*) et l'IL-1 β (interleukine 1 β) (Hebbel et al., 1997; Solovey et al., 1997). Les lésions de l'endothélium entraînent aussi la libération de cellules endothéliales circulantes et par endroit une exposition de la matrice sous-endothéliale et de ses composants, en particulier la FBN, la TSP et la laminine (LAM), importante pour les interactions avec Lu/BCAM et les intégrines $\alpha_4\beta_1$ (Telen, 2016).

Polynucléaires neutrophiles (PNN) et plaquettes sont élevés chez les patients drépanocytaires à l'état basal, même en dehors des CVO (Allali et al., 2020; Conran et al., 2018). Il a été montré que l'hyperleucocytose est un marqueur de mauvais pronostic et plusieurs études ont éclairé le rôle des PNN au cours des CVO, en particulier celles réalisées sur modèle murin (Elmariah et al., 2014; Miller et al., 2000). Les neutrophiles expriment des molécules d'adhérence qui varient en fonction de leur état d'activation et au cours de leur vieillissement. La L-sélectine (CD62L) par exemple diminue au cours de l'activation et du vieillissement. Ils expriment aussi des ligands de sélectines tels la molécule multifonctionnelle CD44 qui se lie entre autres à la E-sélectine endothéliale, tout comme CD66a/CEACAM-1 (*Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1a*), ESL-1 (*E-selectin-ligand*), ou CD162/PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) (**Figures 10 et 11**). P- et E-sélectines endothéliales jouent un rôle clef dans le « rolling » initial des neutrophiles. L'activation des PNN progresse alors via une signalisation « inside-out » qui s'accompagne d'un changement conformationnel des intégrines β_2 , notamment l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18 ou Mac-1) et l'intégrine $\alpha_L\beta_2$ (CD11a/CD18 ou LFA-1) aboutissant à une adhérence ferme avec l'endothélium activé (*via* ICAM-1) et la matrice sous-endothéliale (notamment à la FBN) (Canalli et al., 2011). Le vieillissement des PNN s'accompagne également d'un changement phénotypique. Par exemple, lors de leur maturation, on observe une commutation de l'expression des récepteurs aux chimiokines avec CXCR4 (CD184) qui décroît progressivement alors que CXCR2 (CD182) augmente. Au total, on peut ainsi distinguer une population de PNN jeunes «CD62L^{high}/CD184^{low}» et une population «CD62L^{low}/CD184^{high}» de PNN âgés très adhérents et surtout capables d'interagir avec les GR via l'interaction hétérotopique Mac-1/CD44 et sans doute à un moindre degré VLA4/VCAM1. Les PNN circulants présentent un phénotype activé pro-adhérent, une expression basse de la L-sélectine et élevée de Mac-1.

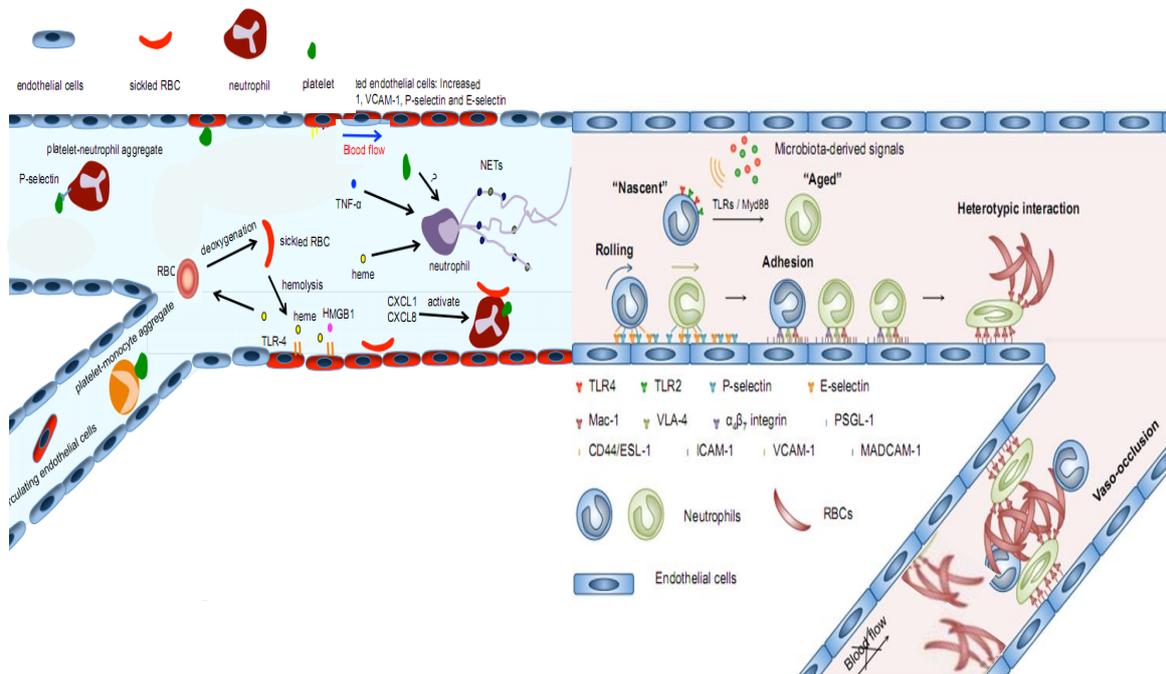


Figure 11 : Schéma global de la vaso-occlusion représentant les interactions complexe de tous les éléments figuré du sang entre eux et avec l'endothélium vasculaire. L'hémolyse induit la libération d'hème libre, qui peut activer les cellules endothéliales, les GR et les monocytes, induisant la libération de $TNF\alpha$ et d' $IL-1\beta$. L'adhérence des plaquettes et des GR active également les cellules endothéliales et augmente l'expression de molécule d'adhérence dont ICAM-1, VCAM-1, P- et E-Sélectine. Les plaquettes peuvent également former des agrégats avec les neutrophiles et monocytes circulants. Les PNN activés roulent et adhèrent à l'endothélium et initient la vaso-occlusion en capturant les GR falciformés. L'hème peut également induire la formation de NETs (Zhang et al., 2015).

L'implication des plaquettes a été montrée de façon plus récente. Les plaquettes sont activées chez les patients drépanocytaires à l'état basal et davantage pendant les CVO (Villagra et al., 2007; Westwick et al., 1983). En témoigne l'augmentation de marqueurs de l'activation plaquettaire comme la TSP, la chimiokine PF4 (*platelet factor 4*) ou CXCL4 (*CXC-chemokine ligand 4*) et les microparticules plaquettaires (Hebbel et al., 2016; Novelli et al., 2015; Wun et al., 1998). Les plaquettes activées sont capables de former des agrégats avec plusieurs types cellulaires, y compris les GR, les monocytes et les PNN. Par ces propriétés, elles sont aussi impliquées dans les mécanismes de la CVO.

Les phénomènes d'activation cellulaire et le stress oxydatif s'accompagnent aussi de libération de microparticules (MPs) à partir de toutes les cellules présentes dans le vaisseau. Chez le sujet drépanocytaire, ces MPs sont élevées à l'état basal et encore plus pendant les CVO. Au-delà

des MPs d'origine érythrocytaires dues aux phénomènes de faldi/défalciformation déjà mentionnées, on retrouve des MPs essentiellement d'origine plaquettaire mais aussi leucocytaire et endothéliale. Elles portent à leur surface de la phosphatidylsérine qui leur confère une activité procoagulante et aussi des composants membranaires caractéristiques du type cellulaire dont elles sont issues. Leur mesure est un paramètre permettant d'estimer l'état d'activation des différents types cellulaires. Mais elles sont aussi susceptibles d'établir des interactions hétérotypiques et par là, de participer directement au processus physiopathologique. Il a été montré que MPs érythrocytaires produites *in vitro* peuvent induire la production de ROS par les cellules endothéliales et un phénotype pro-inflammatoire et pro-adhésif dans un modèle murin (Camus et al., 2012). Plus récemment, notre groupe a confirmé et élargi ces observations en montrant que cet effet sur les cellules endothéliales était également observé avec les MPs circulantes isolées de patients drépanocytaires (Garnier et al., 2020).

1.3.3.2 Inflammation stérile

La drépanocytose se caractérise également par un état inflammatoire présent même à l'état basal (**Figure 7d**). Il peut être qualifié d'inflammation « stérile » car induite en l'absence de tout micro-organisme (Rubartelli et al., 2013). Alors que dans l'inflammation classique, déclenchée par les microorganismes, les facteurs initiateurs principaux sont les PAMPs (*Pathogen-associated molecular pattern*), ici ce sont les DAMPs érythrocytaires libérés par l'hémolyse, au premier rang desquels, l'hème libre (**Figure 12**) (Nader et al., 2020). Ces derniers agissent comme des activateurs de la voie TLR4 (*Toll like receptor 4*) molécule dont l'expression est augmentée à la surface des cellules immunitaires (lymphocytes B, T, cellules NK, monocytes) chez les patients drépanocytaires (Dagur et al., 2018). La signalisation TLR4 induit la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que le $TNF\alpha$, IL8, IL6, IL1 β , et RANTES par les monocytes et les macrophages contribuant ainsi aux activations cellulaires et conduisant aux interactions/adhérence cellulaires décrites plus haut (Belcher et al., 2014; Dutra et al.,

2014). Les ROS jouent un rôle central important dans un cercle vicieux où ils sont à la fois facteurs déclenchants et produits de l'inflammation.

Un autre effet notable de l'hème libre est l'induction de la NETose par les PNN. Il s'agit du phénomène de production de NETs (*neutrophil extra cellular trap*) ou pièges extracellulaires des neutrophiles. Les NETs sont constitués de filaments de chromatine décondensée donc d'ADN et d'histones, sur lesquels restent fixés des constituants nucléaires ou issus du cytosquelette.. D'autres protéines sont présentes, majoritairement granulaires, comme l'élastase neutrophile (NE), la lactoferrine, la myéloperoxydase (MPO) et la PAD4 (*protein-arginine deiminidase type 4*). Activées par les ROS, NE, MPO et PAD4 participent au déroulement des filaments de NET en assurant une dégradation partielle des histones. Lorsque l'immunité innée est initiée par les infections, les NET servent de pièges pour les pathogènes et participent ainsi à leur neutralisation. Mais les NET piègent aussi de nombreuses protéines plasmatiques dont certaines impliquées dans l'hémostase et la coagulation, comme le facteur Willebrand (FW), le facteur XII et le facteur tissulaire (FT) (Fuchs et al., 2010; Stakos et al., 2015; von Brühl et al., 2012).. Les NET favorisent également l'activation plaquettaire. Par tous ces effets, ils participent à la pathogénie de nombre de pathologies impliquant les mécanismes inflammatoires et en particulier de la drépanocytose. Il a été démontré dans un modèle murin de SCD, que les NETs participent directement au développement d'événements vaso-occlusifs (Chen et al., 2014).

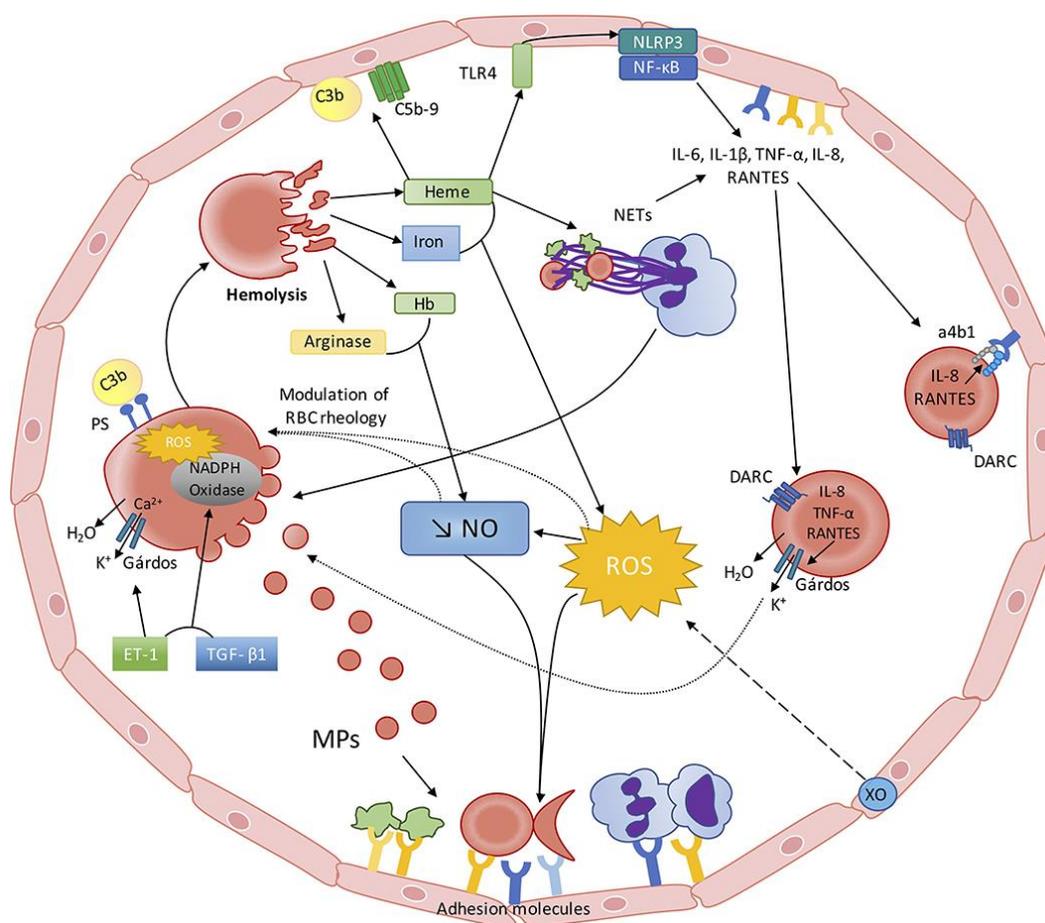


Figure 12 : Le cercle vicieux de l'inflammation dans la drépanocytose. RBC : red blood cells, Hb : hémoglobine, PS : phosphatidylsérine, ROS : reactive oxygen species, MPs : microparticules, DARC : Duffy Antigen receptor for chemokine, XO : xanthine oxydase, NETs : neutrophil extracellular traps, $\alpha_4\beta_1$: Intégrine $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4 very late antigen-4), C3b : facteur C3b du complément, C5b-9 : complexe terminal du complément C5b-9, RANTES : regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted, TLRs : toll-like receptors , TNF- α : tumor necrosis factor- α , IL-1 β : interleukine-1 β , IL-6 : interleukine-6, IL-8 : interleukine-8, NLRP3 : nucleotide-binding, LRR and PYD domains containing protein 3, NF- κ B : nuclear factor-kappa B (Nader et al. 2020).

Pour compléter ce cercle vicieux, il est à noter que les chimiokines inflammatoires IL8 et RANTES (*Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*) majorent l'activation du canal Gardos décrite plus haut par un mécanisme dépendant de la protéine membranaire DARC (*Duffy Antigen Receptor for Chemokines*) (Durpès et al., 2010).

1.3.3.3 Dysfonction endothéliale

Le terme «dysfonction endothéliale» inclut toutes les anomalies structurelles et fonctionnelles de l'endothélium dans des conditions pathologiques. Beaucoup ont été décrites plus haut. Ce

chapitre traitera des anomalies de la régulation du tonus vasculaire normalement assurée par l'endothélium (**Figure 7c**). L'homéostasie vasculaire dépend notamment d'une balance fine de la production endothéliale de médiateurs vaso-dilatateur et vaso-constricteur, les deux principaux étant respectivement le monoxyde d'azote (NO) et l'endotheline-1 (ET-1) (Alonso et al., 2003).

Des mécanismes intriqués et antagonistes participent à ce dysfonctionnement. D'un côté, l'augmentation de la viscosité sanguine se traduit par une augmentation des contraintes de cisaillement appliquées aux parois vasculaires qui va conduire à une stimulation de l'activité de la NO-synthase endothéliale (eNOS) et donc à une augmentation de la production de NO. Il en est de même de l'interaction entre l'endothélium et les GR irréversiblement falciformés. Cependant, ces mécanismes supposés générer une vasodilatation compensatrice Connes, et al., 2013) sont contrecarrés notamment par une augmentation parallèle de l'ET-1 vaso-constrictrice et surtout par les conséquences de l'hémolyse intra-vasculaire.

Les patients drépanocytaires ont un taux plus élevé d'ET-1 plasmatique comparé à des contrôles sains (Rybicki et al., 1998). Ce taux est encore plus élevé au moment de la CVO et décroît lentement dans les semaines qui suivent la résolution de la crise (Ergul et al., 2004). Au-delà de son effet vasoconstricteur, d'autres travaux ont montré l'effet de l'ET-1 chez la souris dans l'accumulation des PNN au niveau des capillaires pulmonaires, myocardiques et rénaux, en lien avec une augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ à leur surface (Espinosa et al., 1996; López Farré et al., 1993). Les inhibiteurs du récepteur à l'ET-1 ont été proposés comme une voie thérapeutique potentielle (Fox & Kasztan, 2016; Koehl et al., 2017).

Mais il semble bien que ce soit les conséquences de l'hémolyse qui participent de façon majeure au dysfonctionnement endothélial (**Figure 13**).

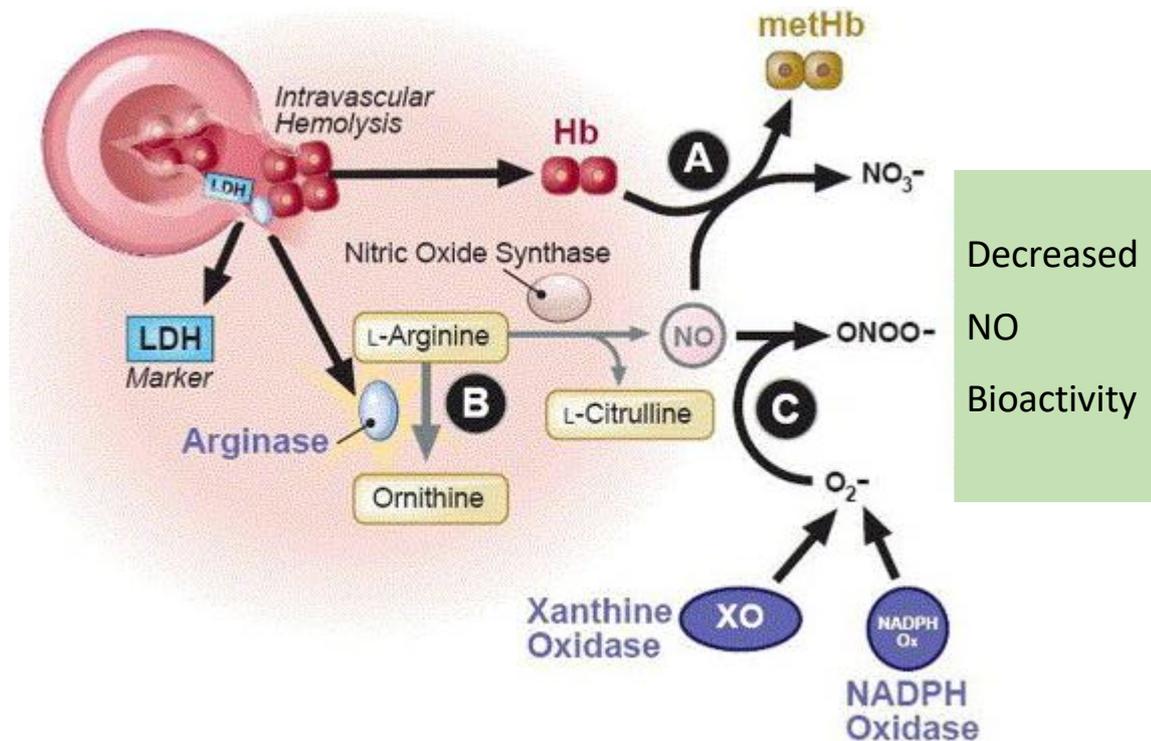


Figure 13 : Conséquences de l'hémolyse sur le métabolisme du monoxyde d'azote (NO). L'hémolyse libère de la lactate déshydrogénase (LDH), de l'hémoglobine libre et de l'arginase qui se répandent dans le plasma. L'hémoglobine réagit avec le NO pour produire de la méthémoglobine (metHb) et des nitrates (NO_3^-) (A). L'arginase dégrade l'arginine nécessaire à la synthèse du NO (B). Le taux accru de xanthine-oxydase à la surface endothéliale et de NADPH-oxydase mitochondriale entraîne des concentrations élevées de peroxynitrite (ONOO^-) et l'anion superoxyde (O_2^-) (C) (Kato et al., 2017).

Premièrement, lorsque l'hémoglobine est libérée dans le plasma, il se produit un phénomène d'auto-oxydation qui engendre la production de radicaux oxydatifs dont HO^\bullet doués d'une action vasoconstrictrice (Alayash, 2018). Deuxièmement, La production de NO est futile car celui-ci est inactivé par deux mécanismes. L'auto-oxydation de l'hémoglobine libre s'accompagne de la transformation de NO en nitrate NO_3^- inactif (Figure 7c et Figure 13). De plus, les ions superoxyde $\text{O}^{\bullet-}$ (ou O_2^-) produits en grande quantité dans la drépanocytose transforment le NO en peroxynitrite $\text{O}=\text{NOO}^-$ inactif. Ces derniers proviennent de l'action de la NADPH oxydase mitochondriale et de la xanthine oxydase (XO) à la surface endothéliale, deux enzymes dont la quantité est élevée en réponse aux cytokines pro-inflammatoires et à l'ischémie. Troisièmement, l'hémolyse libère également l'arginase érythrocytaire qui va

dégrader l'arginine plasmatique. Or cette dernière est le substrat utilisé par la eNOS pour produire le NO. On a donc un cercle vicieux dans lequel non seulement le NO produit est détruit, mais son précurseur est déplété, prévenant une nouvelle synthèse compensatoire. Il en résulte une diminution drastique de la biodisponibilité du NO et donc une annihilation péjorative du stimulus vasodilatateur majeur au profit des stimuli vaso-constricteurs. Sur le long terme, les drépanocytaires développent une « rigidité » vasculaire pouvant conduire à une augmentation de la pression systolique.

La diminution de la biodisponibilité du NO a aussi d'autres conséquences fonctionnelles : elle favorise l'expression de molécules d'adhérence sur les cellules endothéliales, la production de chimiokines et l'activation des plaquettes avec notamment une expression élevée de P-sélectine).

1.4 Présentation clinique

1.4.1 Complications aiguës de la drépanocytose

1.4.1.1 Crise vaso-occlusive osseuse

Les crises drépanocytaires sont des accidents vaso-occlusifs aigus douloureux qui émaillent la vie des malades. Ces crises sont tantôt spontanées, tantôt provoquées par un facteur tel que : les modifications thermiques (la forte chaleur, le froid, l'humidité) ; les pertes hydriques (les vomissements, la diarrhée) ; l'effort physique intense ; la compression segmentaire prolongée ; l'insuffisance ventilatoire (apnée du sommeil, hypertrophie amygdalienne, asthme, les voyages en avion non pressurisé, le séjour en altitude) ; les infections ; le stress psychique etc... (Darbari et al., 2020; Mousa et al., 2010). Les crises douloureuses ostéo-articulaires sont les plus fréquentes et les plus connues des manifestations de la drépanocytose. Le syndrome « pieds-mains » ou dactylite est la manifestation révélatrice chez le nourrisson (Mousa et al., 2010). Il

se traduit par une tuméfaction aiguë et douloureuse du dos des mains et des pieds. Le gonflement des extrémités empêche les mouvements des mains et la marche du fait de la douleur. Il s'accompagne de fièvre au début. Chez l'enfant et l'adolescent, les crises douloureuses des os longs sont les plus fréquentes ainsi que les douleurs périarticulaires. Les atteintes vertébrales sont fréquentes. Elles peuvent provoquer des raideurs de la nuque. Chez l'adolescent, les crises dorsolombaires et thoraciques sont plus fréquentes que celles des os longs.

1.4.1.2 Syndrome thoracique aigu (STA)

C'est l'une des complications majeures des syndromes drépanocytaires et reste la principale cause de mortalité chez l'adulte (Desai et al., 2013). Il peut survenir chez des patients auparavant peu ou non symptomatiques, notamment chez ceux porteurs d'un syndrome drépanocytaire composite. Il correspond à l'association de toute nouvelle image pulmonaire à l'un des symptômes suivants : fièvre, dyspnée ou douleur thoracique (Desai et al., 2013). Cette agression pulmonaire aiguë, qui peut évoluer vers le syndrome de détresse respiratoire aiguë, est rarement isolée. Elle est déclenchée par un certain nombre de causes ou facteurs, parmi lesquels on peut citer : les infections (*Streptococcus pneumoniae*, *Chlamydiae pneumoniae*, *Mycoplasme pneumoniae*, Virus), l'hypoventilation alvéolaire (infarctus osseux thoracique, chirurgie abdominale, affection hépatobiliaire, surdosage en opiacés, grossesse), l'occlusion vasculaire (embolie graisseuse, embolie cruriale, thrombose in situ) (Vichinsky et al., 2000).

1.4.1.3 Priapisme aigu

Le priapisme est une érection douloureuse, prolongée, non liée à une stimulation sexuelle. Il est dû à une séquestration de sang et un engorgement des corps caverneux. La survenue du priapisme semble impliquer une dysrégulation de la phosphodiesterase 5, une diminution de la biodisponibilité du NO (Anele et al., 2015; Champion et al., 2005). Dans les séries africaines,

la prévalence du priapisme varie entre 30% et 40% au cours de la drépanocytose (Kassogué et al., 2014; Okoko et al., 2014).. Les facteurs de risques de priapisme, rapportés sont une augmentation des taux de lactate déshydrogénase (LDH) élevée, de bilirubine, des aspartates aminotransférases (AST), des réticulocytes, des leucocytes et des plaquettes (Adeyoju et al., 2002). Les patients avec hypertension artérielle pulmonaire ou ulcère de jambe semblent plus exposés à développer un priapisme (Kato, 2012). Pour les facteurs protecteurs, on retrouve l'association à l' α -thalassémie et un taux élevé d'hémoglobine fœtale.

1.4.1.4 Séquestration splénique aiguë

La séquestration splénique aiguë est une complication très mortelle chez l'enfant drépanocytaire (Emond et al., 1985). Elle est secondaire aux infarctus spléniques répétés conduisant progressivement chez l'adulte à l'involution splénique (asplénie fonctionnelle). La séquestration splénique aiguë est définie par une augmentation du volume splénique de plus de 2 cm associée à une chute du taux d'hémoglobine de plus de 2 g/dL, en l'absence d'érythroblastopénie. Elle survient principalement dans les formes homozygotes ou $S\beta^0$ -thalassémiques (Emond et al., 1985) avec une incidence maximale entre 6 et 18 mois (Gill et al., 1995a).

1.4.1.5 Complications infectieuses

Les infections constituent la première cause de mortalité chez l'enfant drépanocytaire (Quinn, 2013). La sensibilité aux infections des patients drépanocytaires est d'origine multifactorielle (Booth et al., 2010): asplénie, anomalies du complément, anomalie de la réponse du polynucléaire neutrophile aux cytokines, entre autres. La gravité de ces infections chez ces

patients, est liée au risque vital de septicémie et à la possibilité de survenue de complications aiguës telles que les crises vaso-occlusives ou syndrome thoracique aigu.

1.4.2 Complications chroniques

1.4.2.1 Hypertension artérielle pulmonaire

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est caractérisée par une pression artérielle pulmonaire moyenne ≥ 25 mmHg et une pression capillaire pulmonaire moyenne ≤ 15 mmHg mesurée par cathétérisme cardiaque droit (Hayes et al., 2014). Une vitesse de régurgitation tricuspidiennne $> 2,5$ m/s est un signe indirect mais facile à mesurer de très haut risque d'HTAP. La prévalence de l'HTAP dans la drépanocytose varie de 10% à 33%, lorsqu'elle est mesurée par cathétérisme cardiaque droit ou indirectement par échocardiographie, respectivement (Wood et al., 2020). La physiopathologie de l'HTAP comprend deux mécanismes : l'obstruction vasculaire et l'hyperplasie intimale. La vasoconstriction est due à une diminution de la biodisponibilité du NO et à une production accrue de vasoconstricteurs tels que l'ET-1 (Gaine, 2000). L'hyperplasie intimale est le résultat de la voie de réponse à l'hypoxie. Spécifiquement, les facteurs induits par l'hypoxie α et β (HIF- α et HIF- β) subissent une translocation nucléaire. Le complexe α/β active la transcription de gènes qui augmentent la prolifération cellulaire et l'inflammation, provoquant ainsi une hyperplasie intimale et une vaso-occlusion. L'état d'hypercoagulabilité pourrait favoriser l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires par des phénomènes de thrombose *in situ* (Ataga et al., 2008). Cet état d'hypercoagulabilité se caractérise par une activation plaquettaire accrue, une augmentation des MPs, l'expression de la PS, du facteur tissulaire, du facteur von Willebrand, une diminution des taux plasmatiques des anticoagulants naturels (protéines S et C), une activation anormale du système fibrinolytique (Noubouossie et al., 2016). Chez les souris drépanocytaires, les agrégats plaquettes-PNN contribuent à des embolies artériolaires pulmonaires notamment via la P-selectine (Bennewitz et al., 2017). Les plaquettes activées semblent donc contribuer la

pathogénie de l'HTAP, en favorisant la thrombose in situ et en libérant des molécules vasoactives et/ou des médiateurs mitogènes (Villagra et al., 2007).

1.4.2.2 Néphropathie

L'atteinte rénale est l'une des principales causes de mortalité au cours de la drépanocytose. L'anémie hémolytique chronique caractéristique de la drépanocytose induit une augmentation du débit de filtration glomérulaire via l'augmentation du débit cardiaque. La tendance accrue à la falciformation des hématies drépanocytaires dans la médullaire rénale, due à l'hypoxie, l'acidose et l'hyper osmolarité contribue à la survenue de la néphropathie (Nath & Hebbel, 2015). En dehors de l'hyper filtration glomérulaire et de la microalbuminurie, la néphropathie drépanocytaire comporte un spectre de manifestation incluant l'hyposténurie et une protéinurie macroscopique. Ces anomalies peuvent être d'apparition précoce et pouvant évoluer jusqu'au stade d'insuffisance terminale. La prévalence de la microalbuminurie chez les enfants SS africains varie entre 20% à 28% (Eke et al., 2012; Ranque et al., 2014) Dans la population adulte de même phénotype, cette prévalence est estimée entre 19% à 69% (Day et al., 2012).

1.4.2.3 Ulcères de jambe

L'ulcère de jambe est une perte de substance cutanée plus ou moins profonde, d'évolution chronique et sans tendance spontanée à la cicatrisation. C'est une complication chronique handicapante de la maladie drépanocytaire (Monfort et al., 2020). Elle survient plus fréquemment à partir de l'adolescence chez les patients homozygotes ou $S\beta^0$ -thalassémique ayant un bas taux d'hémoglobine de base (profil hyperhémolytique) (Minniti et al., 2010). Son évolution est caractérisée par la chronicité et la survenue fréquente de récurrences après cicatrisation. La prévalence géographique est variable avec environ 75% des patients atteints en Jamaïque contre seulement 10% en Amérique du Nord (Minniti et al., 2010). En Afrique, la

prévalence des ulcères de jambes chez les drépanocytaires a été estimée entre 13% et 22% (Ndiaye et al., 2016).

1.4.2.4 Ostéonécrose aseptique

La nécrose osseuse avasculaire est une complication fréquente chez l'adulte drépanocytaire. Sa physiopathologie est encore obscure (Adesina et al., 2019; Naseer et al., 2016). En dehors des ischémies répétées, il semblerait que l'hyperviscosité sanguine limite le retour veineux, associée à une augmentation de la pression épiphysaire humérale et fémorale. Cette pression diminue l'afflux artériel entraînant ainsi une hypoxie au niveau osseux. Pour Lemonne et al, la présence d'une nécrose avasculaire n'est pas associée à une modification de la viscosité sanguine, malgré les variations du taux d'hémoglobine et d'hématocrite. Il semblerait qu'une augmentation de l'hémoglobine puisse être associée à la survenue d'ostéonécrose indépendamment de la viscosité sanguine (Lemonne et al., 2013).

1.4.2.5 Rétinopathie

La rétinopathie drépanocytaire est une complication chronique d'installation insidieuse et longtemps asymptomatique. Elle se présente sous deux formes évolutives : la forme non proliférante et la forme proliférante, cette dernière conditionnant le pronostic fonctionnel visuel (Duan et al., 2019). Son diagnostic est facile par l'examen du fond de l'œil à l'aide d'un verre à 3 miroirs, complété si besoin, par une angiographie à la fluorescéine, mais également par d'autres techniques non invasives comme l'ophtalmoscopie à la lampe à fente, ou l'angiotomographie par cohérence optique. La forme proliférante fait toute la gravité de l'atteinte oculaire. Elle est classée en cinq stades de gravité croissante (Goldberg, 1971).

1.4.2.6 Vasculopathie cérébrale

La vasculopathie cérébrale de la drépanocytose comporte une atteinte distale de la microcirculation liée à l'effet sludge (ralentissement et agrégation des drépanocytes dans les

petits vaisseaux) et/ou une atteinte proximale des gros vaisseaux, sténosante, progressive (Connes, et al., 2013; Corvest et al., 2018) L'obstruction progressive peut s'accompagner d'un développement de réseaux de collatérales de type moyamoya exposant secondairement à un risque d'accident vasculaire cérébral (AVC) hémorragique. Le mécanisme de ce remodelage vasculaire aboutissant à une hyperplasie de l'intima et de la média, est multifactoriel et serait une réponse à l'agression de l'endothélium vasculaire par les drépanocytes anormalement adhérents et rigides, l'hyperdébit lié à l'anémie et les lésions inflammatoires de reperfusion résultant d'événements occlusifs transitoires. Il existe également une dysrégulation du tonus vasculaire avec diminution de l'oxyde nitrique (NO), ainsi qu'un état d'hypercoagulabilité avec une augmentation du facteur VIII, de l'antigène du facteur Willebrand et une diminution de la protéine S (Connes, et al., 2013). Dans 25% des cas, les AVC sont expliqués par une obstruction des petits vaisseaux corticaux et sous-corticaux, secondaire à l'hypoxie et à l'effet sludge. Les territoires dits "jonctionnels", particulièrement sensibles aux variations de débit de perfusion, sont le plus concernés par ce mécanisme. Dans ces zones, les infarctus touchent préférentiellement la substance blanche. Les symptômes cliniques les plus fréquents sont l'hémiplégie, l'aphasie ou la dysphasie avec ou sans convulsions. Les facteurs de risque de survenue d'AVC identifiés sont une anémie sévère de base (< 7 g/dl), une hypertension artérielle systémique, un antécédent d'accident aigu transitoire, un antécédent de STA récent ou répété, et une hypoxie nocturne (Ohene-Frempong et al., 1998).

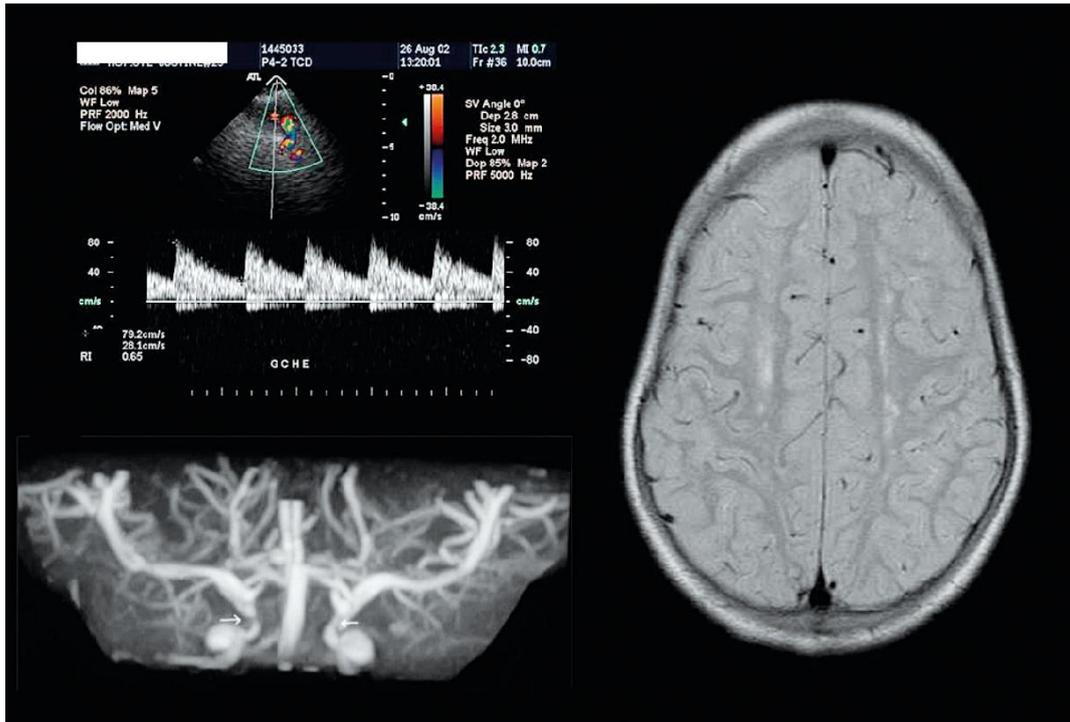


Figure 14. Imagerie de la vasculopathie cérébrale. A) Doppler transcrânien : le paramètre mesuré est la moyenne des vitesses maximale au cours d'un cycle ; B) Angio-IRM : sténoses des 2 siphons carotidiens ; C) IRM, séquence T2 : hypersignaux de la substance blanche, témoignant de l'atteinte de la microcirculation avec des lésions ischémiques bilatérales (Guitton, 2016).

1.4.3 Variabilité des phénotypes cliniques

Bien que résultant d'une mutation unique, la drépanocytose se caractérise par un grand polymorphisme dans son expression clinique. Nous avons déjà vu que les divers génotypes s'accompagnent de sévérité différente. Les formes sévères SS ou $S\beta^{\circ}$ Thal se distinguent des formes plus modérées SC ou $S\beta^{+}$ Thal. Cependant, la grande variabilité interindividuelle de présentation de la maladie est également observée au sein d'un même génotype. Cette variabilité s'exprime à la fois dans le type de complications observées chez un patient donné par rapport à un autre et aussi dans la sévérité globale des complications. Il n'existe pas de score de sévérité consensuel, néanmoins plusieurs paramètres peuvent être pris en compte comme l'existence ou non de telle ou telle complication, son âge de survenue, la durée de vie médiane dans tel ou tel groupe de patient. Cette situation complique la prise en charge des patients et le

conseil génétique. Comprendre les mécanismes de cette variabilité est également un enjeu majeur car l'identification de mécanismes atténuateurs est susceptible d'amener à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces mécanismes sont donc depuis des décennies l'objet d'une recherche intense. Dans le début des années 2000, avec la réalisation de l'importance de l'hémolyse dans la pathogénie de la maladie, longtemps mise au second rang par rapport à la vaso-occlusion, a été formulée l'hypothèse de l'existence de deux sous-phénotypes : le phénotype classique hypervisqueux/vaso-occlusif et le phénotype hémolytique associé au dysfonctionnement endothélial. Dans ce modèle, chaque sous-phénotype est associé à un groupe de complication différentes. Mais il est aussi bien établi maintenant que les facteurs d'environnement modulent la présentation de la maladie de même que le fond génétique avec la mise en évidence de gènes modificateurs.

1.4.3.1 Le paradigme des deux sous-phénotypes

La découverte du rôle de l'hémoglobine libre sur la biodisponibilité du NO a conduit à plusieurs études cliniques visant à rechercher une éventuelle association de cet aspect de la physiopathologie avec diverses complications de la maladie. Plusieurs publications réalisées sur des séries de patients au États-Unis et une au Brésil ont suggéré une association entre hémolyse et un groupe de complications incluant HTAP, ulcère de jambe, priapisme et vasculopathie cérébrale. Ces observations ont conduit à la proposition de l'hypothèse de l'existence de deux sous-phénotypes : le sous-phénotype « hémolyse/dysfonction endothéliale » associé aux complications mentionnées plus haut et le sous-phénotype « hyperviscosité/vaso-occlusion » associé aux crises vaso-occlusive, au syndrome thoracique aigu et l'ostéonécrose aseptique (**Figure 15**). Les deux sous-phénotypes ne sont pas exclusifs et sont chevauchants, mais chaque patient balancerait plutôt vers l'un ou l'autre des sous-phénotypes.

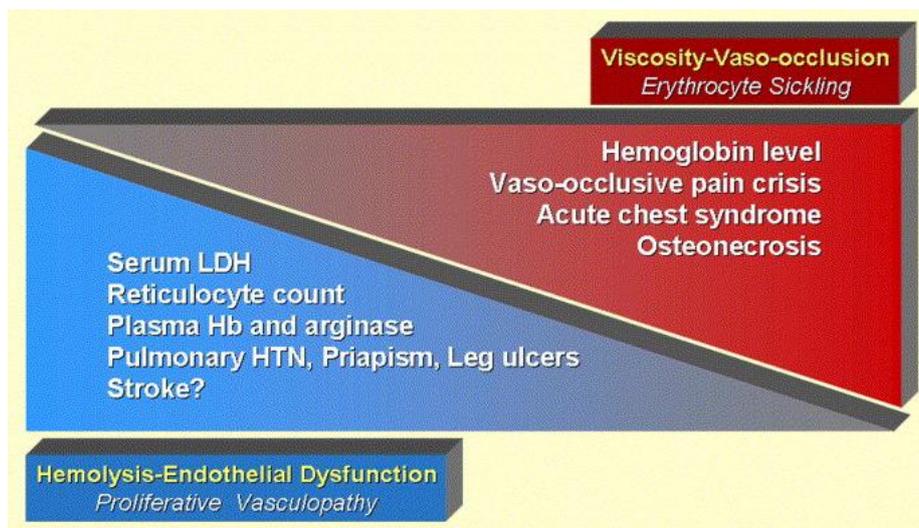


Figure 15 : Schéma représentant les sous phénotypes cliniques de la drépanocytose tel que proposés par le groupe de Kato et Gladwin (Kato et al., 2017) (Gladwin et al., 2008).

Cette classification très séduisante pour beaucoup a cependant été contestée (Bunn et aussi Hebbel) notamment en ce qui concerne le lien entre HTAP et hyperhémolyse (Bunn et al., 2010). Elle n'est pas retrouvée dans la cohorte africaine CADRE qui a servi de support à la première partie de notre travail (Dubert et al., 2017; Ranque et al., 2014).

1.4.3.2 Facteurs de modulation de la sévérité de la drépanocytose

A côté de ces variations possibles du mécanisme pathogénique dominant, la modulation de la présentation de la maladie est multifactorielle, influencée par des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques (**Figure 16**). Les premiers sont connus : déclenchement des crises par un changement brusque de température, augmentation de leur fréquence pendant la saison des pluies dans les pays où elle est observée... mais ils sont relativement peu documentés essentiellement du fait de la pauvreté, jusqu'à il y a peu, de définitions précises et de recueil des paramètres environnementaux (climat, pollution, qualité de vie, facteurs socio-économiques, nutrition, environnement infectieux, etc...). Cette situation est en train de changer dans la plupart de ces domaines, par exemple avec le recueil satellitaire en temps réel des variables et des cycles climatologiques. L'environnement infectieux n'est pas le même dans

les pays du Nord et ceux du Sud. Par exemple le risque bactérien est maximal aux pneumocoques et à *Haemophilus influenzae* dans les premiers et aux salmonelles dans les seconds. A l'évidence, les facteurs socio-économiques et nutritionnels ont une influence majeure dans le pronostic de la maladie.

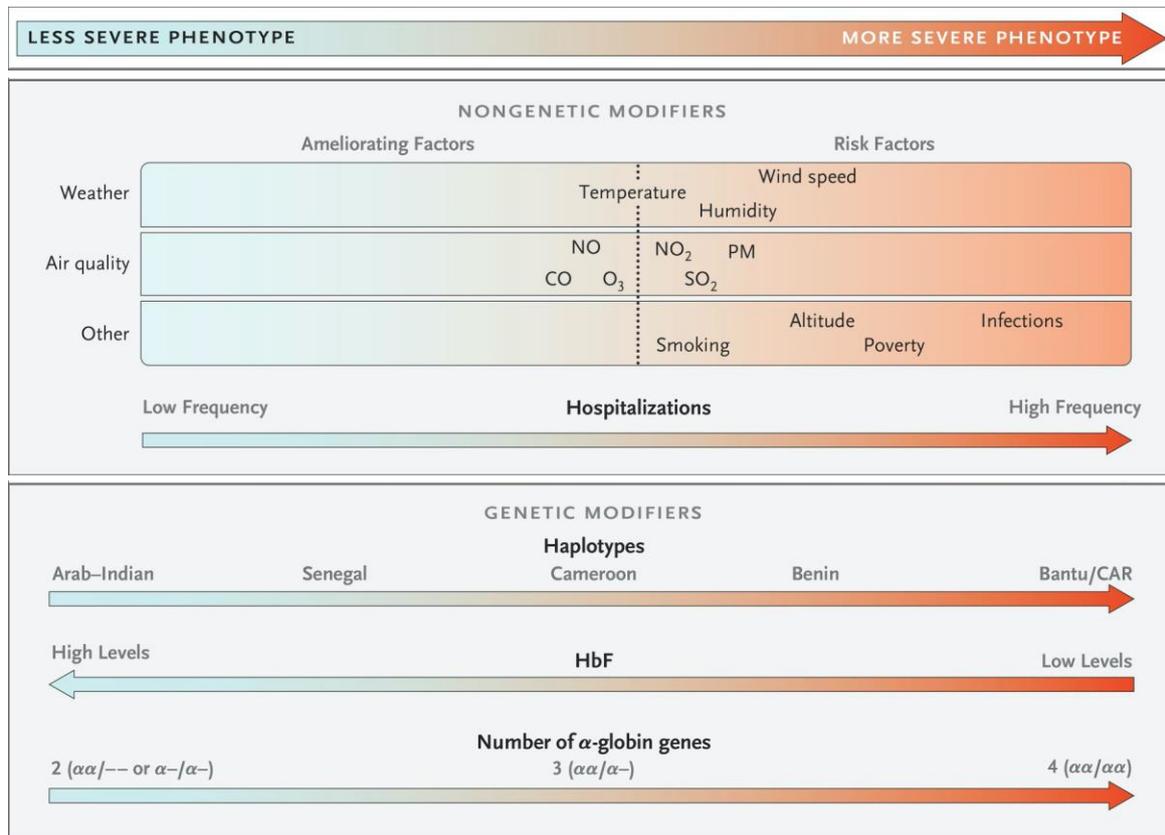


Figure 16 : Principaux modificateurs non génétiques et génétiques de modulation de la sévérité de la drépanocytose. Les flèches indiquent si le facteur augmente ou diminue généralement la sévérité de la maladie. CAR : République d’Afrique Centrale ; CO : monoxyde de carbone ; NO₂ : dioxyde d’azote ; O₃ : ozone ; PM : particules fines ; SO₂ : dioxyde de soufre (Piel, Steinberg, & Rees, 2017).

Les facteurs génétiques de modulation sont les mieux documentés. Deux sont clairement identifiés : 1. la présence concomitante d’un déterminant α -thalassémique et 2. la persistance génétiquement déterminée de l’expression de l’HbF à un taux élevé.

La présence d’un déterminant α -thalassémique agit en diminuant la concentration corpusculaire moyenne de l’HbS et donc la tendance à la polymérisation. Elle semble atténuer le sous-

phénotype hémolytique et les complications qui lui sont liées (priapisme, ulcères de jambe, lithiase biliaire, complications rénales, vasculopathie cérébral). Globalement atténuatrice de la sévérité, ses effets sont en fait contrastés car elle semble faire glisser ses porteurs vers le sous-phénotype vaso-occlusif avec des taux d'hémoglobine plus élevés et un risque accru de CVO et d'ostéonécrose. Une modulation du risque d'HTA n'a pas été démontrée.

La persistance d'HbF à des taux élevés est le facteur atténuateur dont l'influence et le mécanisme d'action sont les mieux documentés. L'HbF diminue la polymérisation de la désoxyHbS directement en s'intercalant dans le polymère en croissance et indirectement en diluant l'HbS dans le globule rouge. Globalement les patients présentant les taux les plus élevés d'HbF sont ceux qui ont la durée de vie la plus longue (Platt et al., 1994). Ils présentent une fréquence plus faible de VOC et de STA et ce malgré une durée de vie des GR et un taux d'Hb élevés. Les études conduites chez des couples de jumeaux drépanocytaires ont montré un taux d'héritabilité élevé (0,98 chez les jumeaux monozygotes contre 0,63 chez les dizygotes), indiquant un fort déterminisme génétique au taux d'HbF (Weatherall et al., 2005). En 1985, les groupes de Labie et Nagel ont identifié le premier marqueur génétique lié au taux d'HbF : un site polymorphe pour l'enzyme *XmnI* en amont du gène $G\gamma$ de globine foétale sur le chromosome 11, *HBG2* (Labie et al., 1985). En établissant les haplotypes de polymorphismes dans la famille des gènes β , ils démontraient que le gène β^S pouvaient résider dans des environnements génétiques différents dans les épices de la drépanocytose. Pour la première fois, ils établissaient une corrélation entre des marqueurs génétiques et la présentation clinique de la maladie (**Figure 17**).

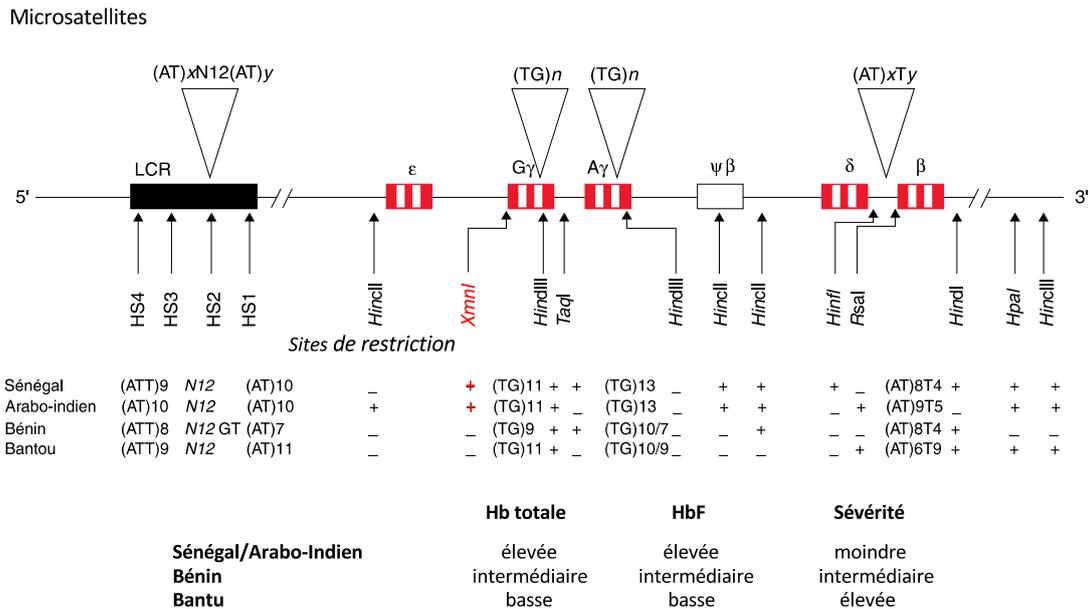


Figure 17. Haplotypes du locus β -globine. Les polymorphismes de restriction (RFLP) sont représentés par le signe + ou - indiquant la présence ou l'absence d'un site de clivage pour l'enzyme concerné. du locus β -globine : et microsatellites, qui constituent l'environnement génique du gène muté. Le polymorphisme des séquences microsatellites concerne le plus souvent le nombre de répétitions de (AT) ou de (GT). Ensemble, RFLP et microsatellites forment les haplotypes étendus. Sont représentés ici les 4 haplotypes majeurs liés à la mutation β^S (Lapie & Elion, 2006).

Un second marqueur lié au niveau d'expression de l'HbF sera découvert en 1996 par le groupe de Thein dans la région intergénique *HBSIL-MIB* sur le chromosome 6. Enfin il faudra attendre 2007 et les études génome (GWAS : *genome-wide association studies*) des groupes d'Orkin et de Thein (Menzel et al., 2007; Uda et al., 2008) pour retrouver les deux marqueurs précédents et surtout identifier un troisième marqueur dans le gène *BCL11A* sur le chromosome 2. Ce dernier a conduit à la découverte de Bcl 11a comme un élément régulateur majeur de l'expression de l'HbF.

Ces travaux sur le rôle atténuateur de l'HbF sont d'une importance considérable en terme thérapeutique, car la réinduction pharmacologique ou génétique de l'expression de l'HbF est une voie de recherche intense déjà en utilisation avec l'hydroxycarbamide.

De très nombreuses études ont été réalisées à la recherche d'associations entre marqueurs génétiques et complications spécifiques de la drépanocytose. Les associations publiées sont résumées dans la **Figure 18**.

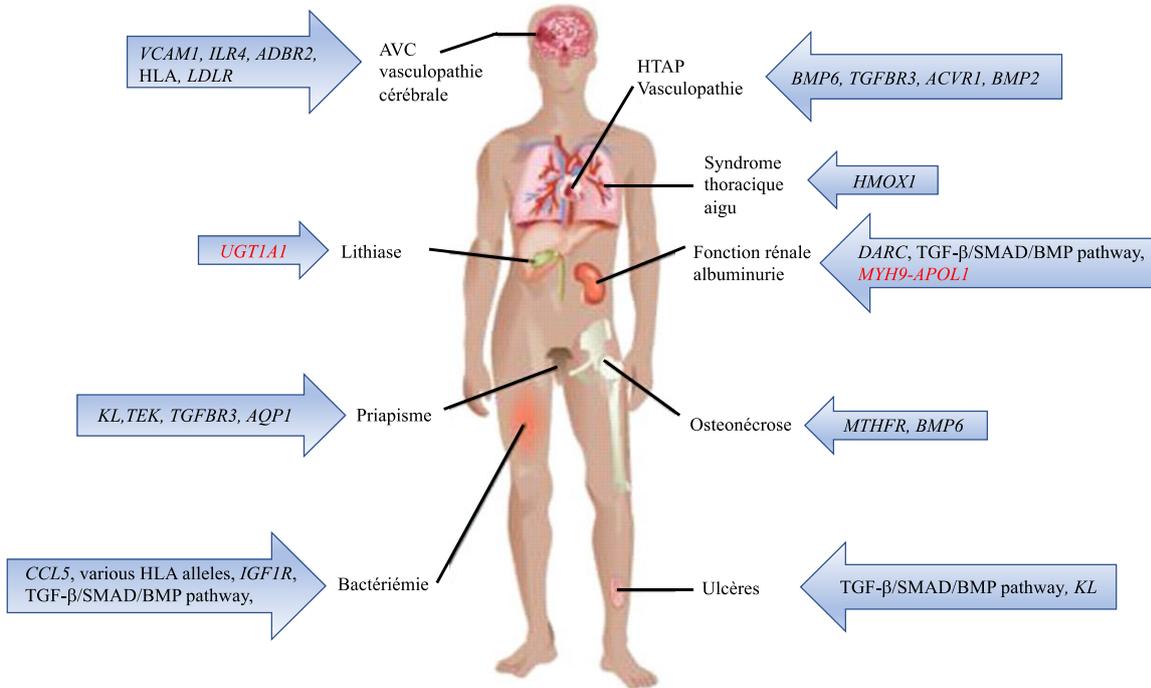


Figure 18 : Associations entre marqueurs génétiques et complications spécifiques de la drépanocytose. AVC: accident vasculaire cérébral, HTAP: hypertension artérielle pulmonaire, *VCAMI*: gène de la molécule d'adhérence cellulaire vasculaire 1, *ILR4*: gène du récepteur de l'interleukine 4, *ADBR2*: gène du récepteur 2 β-adrénergique, *HLA*: gènes de système de l'human leucocyte antigen, *LDLR*: gène du récepteur des lipoprotéines de faible densité, *UGT1A1*: gène de l'uridine diphosphate-glucuronosyltransférase 1A, *KL*: gène Klotho, *TEK*: gène du récepteur de tyrosine kinase TEK, *TGFBR3*: gène du récepteur 3 du facteur de croissance transformant bêta, *AQP1*: gène de l'aquaporine 1, *CCL5*: gène du ligand 5 des CC-chimiokines, *IGF1R*: gène du récepteur du facteur de croissance analogue à l'insuline 1, *BMP6*: gène de la protéine morphogénique osseuse 6, *ACVR1*: gène du récepteur de l'activine A de type I, *BMP2*: gène de la protéine morphogénique osseuse 2, *HMOX1*: gène de l'hème oxygénase 1, *DARC*: gène du récepteur de l'antigène Duffy pour les chimiokines, *MYHA9*: gène de la myosine-9, *APOLI*: gène de l'apolipoprotéine L1, *MTHFR*: gène de la 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase (Steinberg, 2009; Steinberg & Sebastiani, 2012) et synthèse personnelle des données de la littérature.

Cependant il convient de rester très prudents quant à l'interprétation de ces résultats. Beaucoup ont été obtenus avec des méthodologies discutables et surtout deux marqueurs seulement ont été validés dans des études de réplification. Le premier est un polymorphisme de répétition dans le promoteur du gène *UGT1A1* (AlFadhli et al., 2013; Carpenter et al., 2008; Fertrin et al., 2003;

Haverfield et al., 2005). Il s'agit d'un polymorphisme fonctionnel qui influence le taux d'expression de l'UDP-glucuronosyltransférase (UGT), enzyme hépatique de conjugaison de la bilirubine libre. Il est associé à la survenue de lithiases biliaires. Le second est celui de la région génique *MYH9-APOLI* (apo-lipoprotéine 1) associé aux anomalies de la fonction rénale dans la drépanocytose (Genovese et al., 2010; Kao et al., 2008; Kopp et al., 2008). Ce marqueur a une valeur très forte, car il a valeur générale, étant associé à des anomalies rénales dans d'autres pathologies.

1.5 Traitement

1.5.1 Prévention du risque infectieux

Les mesures générales de prévention des infections au cours de la drépanocytose incluent une antibioprofylaxie à la pénicilline orale (Konoty-Ahulu, 1991), une vaccination contre les germes encapsulés notamment le pneumocoque (Sobota et al., 2015) et la vaccination contre l'hépatite B, une prophylaxie antipaludique dans les zones d'endémie, un déparasitage systématique (antihelminthique). Une bonne qualité de vie du patient drépanocytaire passe aussi par une bonne hygiène bucco-dentaire et corporelle, une éducation thérapeutique des patients et/ou leur famille sur l'observance thérapeutique et les facteurs susceptibles de favoriser la survenue des crises vaso-occlusives.

1.5.2 Traitement symptomatique

Le traitement symptomatique de certaines complications aiguës telles que la crise vaso-occlusive, le syndrome thoracique aigu ou le priapisme, repose sur l'hydratation intraveineuse abondante adaptée à l'état cardiorespiratoire du patient, la prise de médicaments antalgiques (paracétamol, anti-inflammatoires non stéroïdiens, morphiniques) et parfois sur la transfusion de concentrés de GR ou les échanges transfusionnels.

1.5.3 Hydroxycarbamide (HC)

C'est un médicament efficace et largement utilisée depuis 1995 dans la prévention des complications de la maladie drépanocytaire (Platt et al., 1995) telles que les crises fréquentes et sévères, l'accident vasculaire cérébral, le priapisme, le syndrome thoracique aigu ou l'anémie chronique sévère. Il s'agit d'un inhibiteur de la ribonucléotide réductase, initialement utilisé pour le traitement des syndromes myéloprolifératifs de l'adulte. C'est une molécule aux effets pléiotropes dont le mécanisme d'action reste encore obscur. Ses propriétés d'induction de la synthèse de l'HbF, ont conduit à proposer cette molécule dans le traitement de la drépanocytose. En effet, l'HbF permet l'interruption de la polymérisation de la déoxy HbS, interférant ainsi avec le processus physiopathologique de la drépanocytose (Stuart et al., 2004). D'autres effets bénéfiques de l'HC ont été identifiés : diminution de la concentration d'HbS dans le GR, augmentation du temps de latence à la polymérisation, amélioration de la déformabilité des GR, réduction de l'hémolyse diminuant ainsi l'anémie, diminution de l'adhérence cellulaire dans la microcirculation avec réduction des molécules d'adhérence exprimées par les réticulocytes, diminution de l'activation endothéliale, réduction du nombre des globules blancs et de leur activation (Benkerrou et al., 2002; Bridges et al., 1996; Maier-Redelsperger et al., 1998; Odièvre et al., 2008). L'HC participe également à l'amélioration du tonus vasculaire par l'amélioration et la biodisponibilité du NO. L'utilisation de l'HC dans l'arsenal thérapeutique de la drépanocytose a considérablement révolutionné la qualité et l'espérance de vie des patients drépanocytaires (Steinberg et al., 2010). La prescription de l'HC est associée à des effets secondaires hématologiques fréquents, dose-dépendants : leuco-neutropénie, anémie, thrombocytopénie. Ces effets sont réversibles après réduction de la posologie. Des effets secondaires extra hématologiques sont fréquents (Agrawal et al., 2014). Il s'agit de l'hyperpigmentation, des ulcérations buccales et parfois quelques épisodes de diarrhée. Enfin,

chez l'homme une oligo/azoospermie est décrite, partiellement réversible à l'arrêt du traitement (Jones et al., 2009).

1.5.4 Thérapeutique transfusionnelle

Les buts de la transfusion sont de corriger l'anémie, de diminuer le pourcentage de GR SS dans la circulation et de réduire l'hémolyse. Les techniques sont la transfusion simple de GR et les échanges transfusionnels (manuels, automatisés). L'échange manuel associe une soustraction de sang total et une transfusion de GR. Il peut être réalisé sur une seule voie d'abord et ne nécessite pas d'équipement sophistiqué. L'échange par aphérèse ou échange érythrocytaire permet de remplacer volume à volume les globules soustraits et minimise ainsi le risque d'accumulation de fer. Les transfusions simples sont réservées aux patients ayant une anémie aiguës avec des signes d'intolérance clinique ou un taux d'hémoglobine ≤ 5 g/dl, une séquestration splénique aiguë, érythroblastopénie ou une accident hémolytique aigu. Les indications formelles d'échange transfusionnel ponctuel sont pour les équipes spécialisées la survenue des complications suivantes : l'AVC, le syndrome thoracique sévère, la crise vaso-occlusive hyperalgique avec effets secondaires limitant l'utilisation de morphiniques, le priapisme aigu d'évolution supérieure à 3 heures, la défaillance multiviscérale, l'infection sévère, toute complication grave intercurrente pouvant mettre en jeu le pronostic vital ou fonctionnel, la nécrose médullaire, la crise vaso-occlusive chez la femme enceinte, la surdité aiguë, et dans certains cas vertige. Un programme d'échange transfusionnel chronique, se justifie dans la prévention primaire de l'AVC en cas de doppler transcrânien pathologique ou de vasculopathie cérébrale sténosante avérée à l'imagerie, la prévention secondaire de l'AVC en cas de vasculopathie sténosante. L'objectif de ces échanges étant le maintien de l'hémoglobine S en dessous de 30%. Les antécédents d'hémolyse post-transfusionnelle ou d'inefficacité transfusionnelle et un poly allo-immunisation constituent les contre-indications de la transfusion. Les problèmes majeurs de la transfusion au cours de la drépanocytose

concernent la surcharge en fer, les réactions hémolytiques post-transfusionnelles et la transmission d'agents infectieux (VIH, HTLV, VHC et VHB). La surcharge en fer est inéluctable lors des transfusions au long cours, chaque concentré de GR apporte 200 mg de fer. Elle doit être prévenue par des échanges érythrocytaires avec ajustement compensatoire à la soustraction sanguine mais aussi par l'instauration d'un traitement chélateur dès que le taux de ferritine devient supérieur à 1 000 mg/l (Kwiatkowski et al., 2004). L'allo-immunisation, conséquence des incompatibilités, pouvant même dans certains cas mettre en jeu le pronostic vital du patient.

1.5.5 Greffe de cellules souches hématopoïétiques

La drépanocytose dans sa forme homozygote SS reste une maladie très sévère, responsable d'une mortalité précoce chez l'adulte et d'une morbidité intense malgré les progrès considérables apportées par l'utilisation de l'HC et des transfusions. La greffe de cellules souches hématopoïétiques (HSCT – *hematopoietic stem cell transplantation*) est actuellement le seul traitement potentiellement curateur (Gluckman et al., 2017). Il peut s'agir de greffe allogénique géno-identique intrafamiliales ou phéno-identique, ou encore de sang du cordon ombilical riche en cellules souches hématopoïétiques. Les indications actuelles de la greffe de moelle osseuse sont l'AVC clinique, vasculopathie cérébrale, le syndrome thoracique aigu récurrent, les crises vaso-occlusives fréquentes malgré l'HC, la néphropathie drépanocytaire, l'ostéonécrose multiple, le priapisme récurrent, l'allo-immunisation érythroïde ≥ 2 anticorps. Le nombre restreint des donneurs HLA-identiques (< 30% pour un patient donné), les considérations socioculturelles et économiques, constituent entre autres des facteurs limitant l'accès à cette thérapeutique (Bernaudin & Dhedin, 2016; Gluckman et al., 2017). La greffe est précédée d'un conditionnement myéloablatif et d'un suivi sous traitement immunosuppresseur avec des conséquences importantes que sont, entre autres, la fragilité temporaire aux infections, une toxicité potentiellement responsable à court terme de complications hépatiques et

neurologiques, et à long terme de stérilité. Les résultats actuels sont très bons (survie sans évènement > 95%) (Gluckman et al., 2017). La réaction du greffon contre l'hôte constitue le risque de morbidité le plus élevé. La greffe de moelle est une technique « lourde », pleine d'espoirs mais encore, sauf exception, non accessible en Afrique sub-Saharienne où la drépanocytose est très fréquente.

1.6 Perspectives diagnostiques et thérapeutiques

1.6.1 Développements du diagnostic biologique

Le diagnostic biologique de la drépanocytose est actuellement basé sur l'électrophorèse de l'Hb et/ou la chromatographie liquide hautes performances (CLHP) par échange de cations. Pour le dépistage néonatal, on utilise la focalisation isoélectrique plus résolutive que l'électrophorèse classique, la CLHP ou l'électrophorèse capillaire. Toutes ces techniques sont basées sur la différence de charge existant entre l'HbA et l'HbS (et aussi les autres variants communs, HbC et HbE). Les appareillages nécessaires ne peuvent être présents que sur des plateformes spécialisées, ce qui nécessite une logistique d'acheminement des échantillons pas toujours très facile à organiser en Afrique. Ils impliquent aussi un délai entre le prélèvement et le rendu du résultat préjudiciable dans les situations d'urgence et, pour le dépistage néonatal, source de perdu de vue de mamans ne restant souvent en Afrique que quelques heures à la maternité. Au vu du bénéfice spectaculaire du dépistage néonatal et d'une prévention précoce des complications graves sur l'espérance de vie partout dans le monde et tout particulièrement en Afrique, on assiste à une mise en place et/ou une extension rapide des programmes de dépistage. Les défis sont différents selon les environnements et les situations. On peut schématiquement les énoncer comme suit : 1. capacité de très grands nombres d'échantillons, 2. rapidité du rendu du résultat et 3. coût du test, particulièrement en Afrique.

En termes de technique diagnostique, on assiste actuellement à deux grandes avancées : le développement de la spectrométrie de masse pour l'identification des variants de l'hémoglobine et le développement de tests rapides.

La spectrométrie de masse, comme son nom l'indique, utilise les différences de masse moléculaire pour séparer les variants de l'hémoglobine. Ses avantages sont la rapidité de l'analyse et donc la capacité à traiter un grand nombre d'échantillons (1000-2000 échantillons/jour) dans des systèmes automatisés sur une plateforme dédiée. Ses inconvénients sont le coût de l'appareillage et sa haute technicité. Elle a été adoptée par 2 des 3 des laboratoires du programme de dépistage en France métropolitaine et plusieurs laboratoires anglais. Son utilisation en Afrique est en cours d'évaluation dans des centres disposant déjà de l'appareillage dans leur laboratoire de microbiologie appliquée à l'identification des pathogènes (Instituts Pasteur de Côte d'Ivoire et de Madagascar).

Les tests rapides, connaissent en ce moment un développement accéléré (McGann et al., 2017). La plupart sont basés sur les propriétés antigéniques des variants de l'hémoglobine et utilisent le LFIA (*lateral flow immunoassay*). Leur sensibilité permet de différencier l'HbS de l'HbF chez les nouveaux nés et leur spécificité la détection de l'HbA, l'HbS et l'HbC (Nguyen-Khoa et al., 2018). Simples à réaliser et à interpréter, sans équipement particulier, ne nécessitant pas de générateur électrique et peu coûteux, ils semblent d'une grande opportunité pour les pays en voie de développement (Segbena et al., 2018).

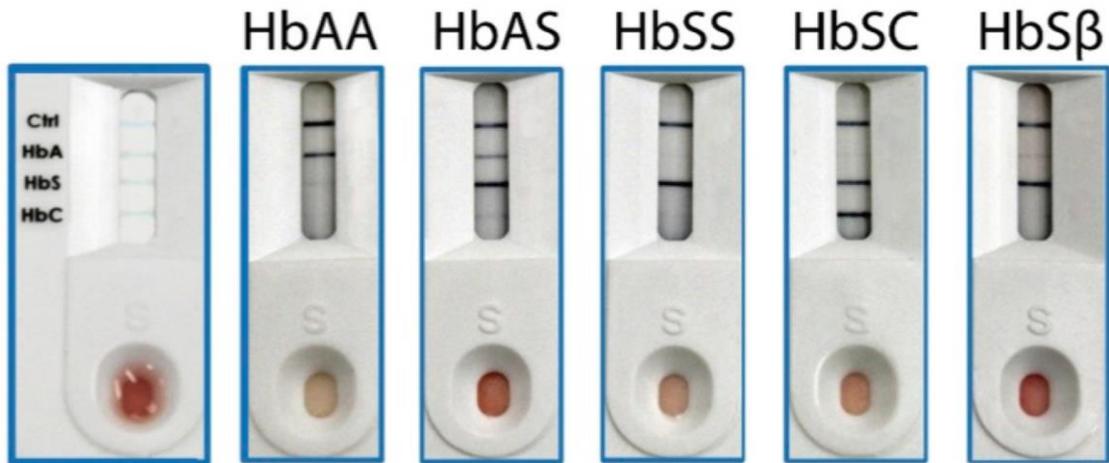


Figure 19 : Exemple de résultats de tests rapides (Sickle SCAN™, BioMedomix). HbAA : sujet normal, HbAS : porteur d'un trait drépanocytaire, HbSS : drépanocytaire homozygote, HbSC : hétérozygote composite SC, HbSβ : hétérozygote composite Sβ-thalassémie (<https://www.biomedomics.com/products/hematology/sickleScan/>).

1.6.2 Avancées thérapeutiques

1.6.2.1 Nouvelles approches pharmacologiques

L'hydroxycarbamide (HC) a fait la preuve de son efficacité et de sa sécurité d'emploi. Elle a drastiquement changé la qualité de vie d'un très grand nombre de patients enfants et adultes et est maintenant très largement utilisée dans les pays développés. Elle l'est aussi de plus en plus dans les pays à revenus bas et moyens (LMIC *low and middle income countries*), bien que son coût (pourtant modeste) y reste encore un problème. Elle a cependant montré ses limites : sujets non-répondeurs (rares), effets non démontrés pour certaines complications de la drépanocytose. Une partie de son efficacité résulte probablement dans son effet pléiotropique sur divers aspects de la physiopathologie de la drépanocytose exposés plus haut (adhérence et interactions cellulaires, activation de l'endothélium et des PNN, etc...). Clairement de nouvelles approches pharmacologiques complémentaires sont nécessaires.

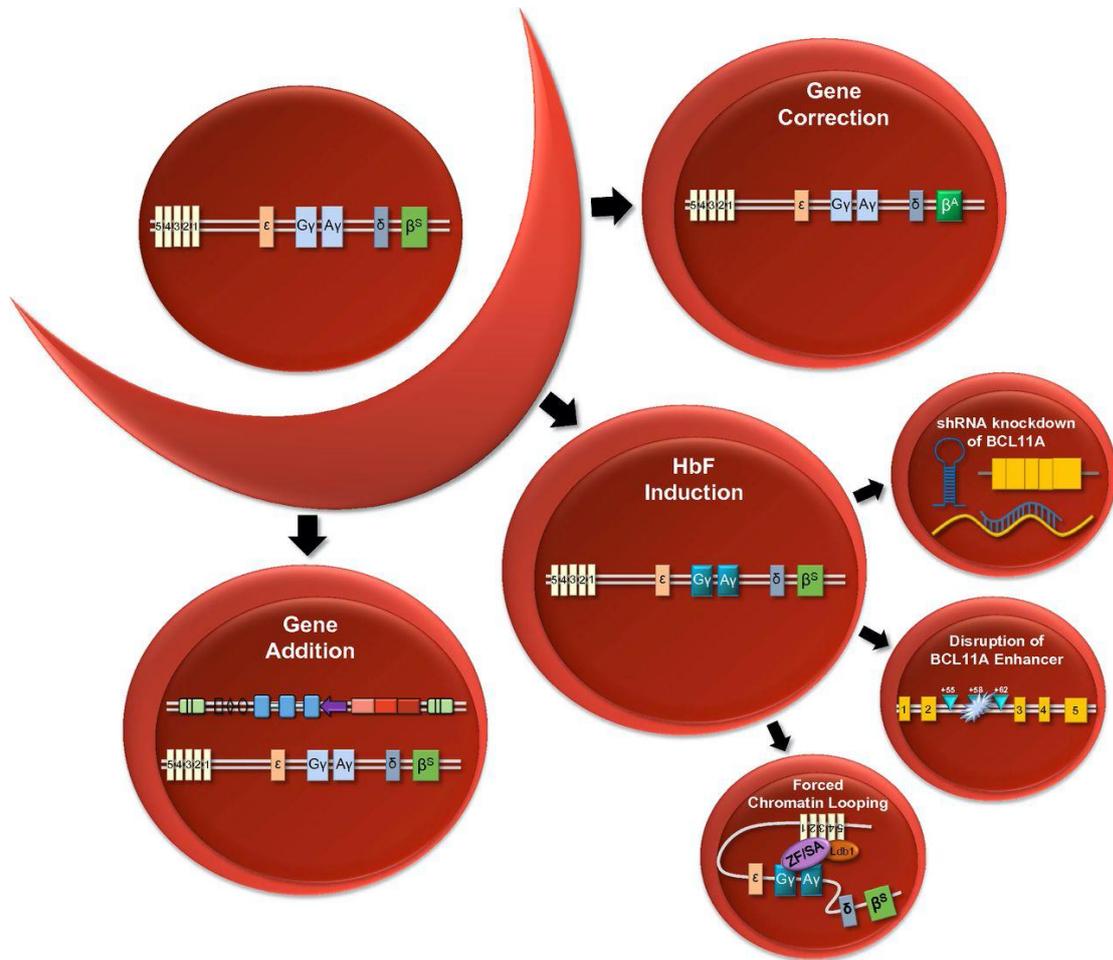
De fait, on assiste actuellement à une accélération remarquable des recherches concernant de nouvelles drogues ciblant divers aspects de la physiopathologie de la maladie. Les voies de recherche concernent essentiellement : 1. la manipulation de l'affinité de l'HbS pour l'O₂, 2. l'inhibition de l'activation des leucocytes et des phénomènes d'adhérence et d'interactions anormales hétérotypiques cellules/cellules dans le vaisseau (cellules endothéliales, globules rouges et plaquettes), 3. l'inhibition de l'activation plaquettaire, 4. la manipulation de la voie de signalisation du NO et 5. la lutte contre l'environnement oxydant. Alors qu'aucune nouvelle autorisation de mise sur le marché n'avait été accordée par la FDA (*Food and Drug Administration*) aux États-Unis ou l'EMA (*European Medicines Agency*) depuis l'approbation de l'HC en 1998, trois nouvelles drogues ont été approuvées en 2017 et 2019. Il s'agit respectivement en Juillet 2017 de la L-glutamine, un antioxydant et en Novembre 2019 du Crizanlizumab, un anticorps monoclonal humanisé anti P-sélectine et du Voxelotor, un ligand de l'HbS se fixant sur l'oxyHbS et la stabilisant au dépend de la désoxyHbS, diminuant ainsi la polymérisation. Un inhibiteur pan-sélectine, mais avec une action préférentielle sur la E-sélectine, le Rivipansel (GMI-1070) est en phase III d'étude. A ce stade, même si elle est espérée, il est peu probable qu'on découvre la « drogue miracle », mais plutôt qu'on aboutisse à des combinaisons efficaces de drogues ayant chacune des effets sur les différentes phases du processus physiopathologique (Hebbel, Elion, & Kutlar, 2018).

1.6.2.2 Thérapie génique

Alternative thérapeutique à la greffe de moelle osseuse allogénique, la thérapie génique est l'objet d'une recherche intense. Elle consiste, grâce au développement actuel des techniques du génie génétique, à modifier *ex vivo* l'ADN de cellules souches hématopoïétiques du patient à traiter, supprimant le problème de la recherche d'un donneur compatible. Dans le domaine des hémoglobinopathies, les premiers essais ont été réalisés en 2007 pour les β -thalassémies et en 2015 pour la drépanocytose (Cavazzana-Calvo et al., 2010; Ribeil et al., 2017). Ils utilisaient

tous le transfert de gène réalisé grâce à un vecteur lentiviral qui permet l'insertion d'une copie de l'allèle non-muté de la β -globine dans l'ADN de cellules souches du patient (Demirci et al., 2018). Dans le cas de la drépanocytose, le « gène médicament » avait de plus été modifié pour incorporer la substitution $\beta 87\text{Gln}>\text{Thr}$. Il s'agissait par là d'introduire dans la chaîne β produite un encombrement stérique entre les résidus $\beta 85\text{Phe}$ et $\beta 88\text{Leu}$ et prévenir leur interaction avec $\beta 6\text{Val}$ sur la chaîne β^S (**Figure 8**, paragraphe 1.3.1.1). L'hémoglobine produite est aussi efficace à interrompre ainsi la polymérisation de l'HbS que l'HbF dont la chaîne γ porte précisément un résidu thréonine en position 87. Les cellules souches hématopoïétiques pour le transfert *ex vivo* sont collectées par ponction médullaire ou plus récemment à partir du sang périphérique après mobilisation par le Plerixafor. Comme dans la greffe de moelle, la réinjection des cellules autologues modifiées est précédée d'une chimiothérapie myélo-ablative mais, contrairement à une allogreffe, le conditionnement est dépourvu, en pré et post-greffe, de tout immunosuppresseur puisqu'il n'y a, en situation autologue, ni risque de rejet, ni risque de réaction du greffon contre l'hôte (Demirci et al., 2018). La première solution proposant cette stratégie vient d'être approuvée par la FDA et la EMA et commercialisée cette année pour les β -thalassémies (ZyntegloTM).

D'autres pistes plus sophistiquées et plus ciblées de modification de l'ADN que le simple apport du « gène médicament » dans les CSH autologues sont en cours d'active exploration, profitant notamment des possibilités d'édition du génome par l'utilisation des systèmes CRISPR-Cas ou de l'approche dite NHEJ (*non-homologous end-joining pathway*). En Août 2020, la FDA a donné l'autorisation de débiter des essais cliniques pédiatriques à la start-up ayant mis au point la procédure « EDIT-301 » dans laquelle le système CRISPR/Cas12a est utilisé pour modifier les régions promotrices des gènes HBG1/2 dans des CSH autologues du patient. Les principales voies de développement des procédures de thérapie génique sont présentées dans la **Figure 20**.



Figures 20 : Les trois grandes voies actuelles de développement de la thérapie génique dans la drépanocytose. Addition de gène : intégration d'un vecteur lentiviral portant une cassette β -globine, γ -globine ou β -globine modifiée anti-polymérisante. Induction de l'expression d'HbF : plusieurs stratégies peuvent être envisagées pour induire l'expression de la γ -globine, incluant i. l'inhibition de gène *BCL11a* médié par shARN, ii. la délétion ou l'inactivation ciblée de l'enhancer érythroïde-spécifique de *BCL11a*, iii. l'induction forcée d'une interaction entre le LCR et les gènes de la γ -globine *via* des modifications chromatiennes. Correction génique : correction directe de la mutation drépanocytaire β^S par édition du génome (Hoban et al., 2016).

Objectifs

Mon travail de thèse sur « Vasculopathie et Inflammation dans la Drépanocytose » a suivi deux grands axes :

1. analyser les déterminants mécanistiques et biologiques des complications vasculaires chroniques de la drépanocytose en Afrique sub-Saharienne,
2. analyser le phénotype des PNN au cours du traitement de la vasculopathie cérébrale par échange transfusionnel chez l'enfant drépanocytaire.

Les objectifs spécifiques pour chacun d'entre eux étaient :

1. de tester la pertinence du paradigme des deux sous-phénotypes hémolytique et hypervisqueux dans le déterminisme des complications vasculaires de la maladie dans le contexte africain, et de chercher des marqueurs spécifiques des complications cliniques dans ce contexte régional,
2. d'appréhender les raisons de l'efficacité incomplète des échanges transfusionnels dans le traitement de la vasculopathie cérébrale en testant l'hypothèse d'un rôle des PNN dont l'importance a été récemment mise en évidence dans la physiopathologie de la drépanocytose.

Un objectif secondaire à la première partie était de tester la faisabilité de la conduite d'une recherche translationnelle sophistiquée dans le cadre d'une collaboration triangulaire Sud-Sud et Sud-Nord équitable.

Résultats

1. Etude des déterminants de la vasculopathie chronique en Afrique sub saharienne

L'histoire naturelle de la maladie en Afrique reste largement inconnue. La drépanocytose se manifeste habituellement dès l'enfance et se caractérise par l'association d'une anémie chronique, de phénomènes vaso-occlusifs aigus et d'une susceptibilité extrême aux infections. Progressivement, s'installent des lésions vasculaires chroniques multi-organes, incluant néphropathie, infarctus osseux, ulcères de jambe, rétinopathie et hypertension artérielle pulmonaire. Il existe une grande variabilité interindividuelle des manifestations cliniques de la drépanocytose. Les raisons de cette variabilité ne sont pas bien élucidées. Des facteurs environnementaux sont clairement impliqués, mais aussi des facteurs génétiques, tels que les haplotypes de la région des gènes β -globine, une α -thalassémie associée et les gènes modulant l'expression de l'hémoglobine fœtale. L'incidence de ces complications vasculaires est différente d'un patient à l'autre mais elles sont la principale cause de décès chez l'adulte, dans les pays développés mais le plus souvent durant l'enfance en Afrique. Au cours de la drépanocytose, plusieurs voies physiopathologiques entraînent une activation cellulaire et la libération de microparticules (MPs). S'il est clairement démontré que les microparticules circulantes sont augmentées chez les patients drépanocytaires, leur pertinence clinique reste controversée et n'a jamais été explorée en Afrique sub-Saharienne. Il est maintenant établi que la drépanocytose s'apparente à une maladie vasculaire, mais les mécanismes précis de cette vasculopathie restent à identifier, ainsi que les marqueurs permettant d'identifier les patients risquant de la développer.

Hypothèse de recherche

Nous faisons l'hypothèse qu'une meilleure caractérisation biologique et fonctionnelle des complications vasculaires chroniques de la drépanocytose, peut conduire à une prise en charge spécifique et surtout plus précoce, avec comme finalité une réduction significative de la morbidité et de la mortalité associées à ces complications en Afrique sub-Saharienne.

Du suivi de 5 ans de l'étude CADRE (Cœur Artère Drépanocytose, identifiant clinique [trial.gov NCT03114137](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03114137)), nous avons conçu une étude cas-témoins (BIOCADRE) nichée dans la cohorte, basée sur des phénotypes extrêmes de la drépanocytose. Nous avons cherché à identifier les marqueurs biologiques associés aux complications vasculaires, en particulier ceux liés à l'hémolyse. Notre projet combine une approche épidémiologique pour identifier des modèles spécifiques de complications d'organes aux organes avec des études expérimentales basées sur des hypothèses physiopathologiques.

Dans un premier article, nous présentons l'étude BIOCADRE, ses résultats globaux et étudions l'association des principales complications chroniques liées à la drépanocytose avec la fonction microvasculaire en utilisant la tonométrie artérielle périphérique, la viscosité sanguine, les marqueurs plasmatiques habituels de l'hémolyse et les variantes de gènes candidats choisis en raison de leur lien avec l'hémolyse ou leur rôle précédemment reconnu dans la gravité de la drépanocytose.

Dans un deuxième article, nous tentons une étude plus physiopathologique en réalisant une caractérisation fine des microparticules circulantes chez ces mêmes patients en recherchant leur valeur comme marqueurs éventuels des complications vasculaires, et comme acteurs dans la pathogénie des complications, tout particulièrement en relation avec l'hémolyse.

1.1 Article 1 : Mechanistic and biological determinants of sickle cell disease vasculopathy in sub-Saharan Africa : the BIOCADRE study

Article en préparation

Résumé : Déterminants mécanistes et biologiques de la vasculopathie drépanocytaire en Afrique sub-Saharienne : l'étude BIOCADRE

Contexte : L'étude CADRE est une cohorte multinationale de patients drépanocytaires, visant à étudier les complications vasculaires chroniques de la drépanocytose en Afrique sub-Saharienne où l'histoire naturelle de cette maladie n'est pas bien établie. Caractéristique majeure de la drépanocytose, la vasculopathie entraînant la survenue de lésions chroniques multi organiques. Pour le suivi de cinq ans des patients de l'étude CADRE, nous avons conçu une étude cas-témoins nichée dans cette cohorte, afin d'étudier de nouveaux marqueurs biologiques et fonctionnels de la vasculopathie chronique.

Patients et méthodes : A partir des centres de Dakar (Sénégal) et de Bamako (Mali), nous avons sélectionné des patients drépanocytaires adultes SS, selon la présence ou l'absence de complications suivantes : vitesse de régurgitation tricuspидienne (VRT) > 2,5 m/s (associée à une hypertension pulmonaire), macroalbuminurie (albuminurie/créatininurie > 300 mg/g), ulcère de jambe, priapisme, ostéonécrose, rétinopathie. Six groupes d'au moins 30 patients SS avec phénotype extrême ont été constitués. Outre l'examen clinique, l'échocardiographie, le bilan hématologique, d'hémolyse et rénal, nous avons collecté des échantillons de plasma et de salive. Immédiatement après le prélèvement sanguin, nous avons mesuré la viscosité du sang et évalué la fonction de microcirculation par tonométrie artérielle périphérique. A partir de l'ADN salivaire, des facteurs génétiques de modulation de la maladie connus ont été analysés ainsi que des gènes candidats impliqués dans le catabolisme de l'hème. Les associations statistiques potentielles entre ces paramètres biologiques, fonctionnels et les complications vasculaires ont été évaluées par régression logistique multivariée.

Résultats : Au total 232 patients adultes SS ont été inclus (106 à Bamako et 126 à Dakar). L'âge médian était de 28,8 ans (+/-11). La population était composée de 58 cas de VTR élevée, 46 cas d'ostéonécrose aseptique, 43 cas de priapisme, 33 cas d'ulcères de jambe, 31 cas de rétinopathie, 22 cas de macroalbuminurie, et 36 patients sans complication vasculaire apparente. Bien que le taux élevé de lactate déshydrogénase soit associé à une VRT élevée (OR 2,6), ni la lactate déshydrogénase ni la bilirubine n'étaient associées au phénotype clinique « hyperhémolytique » (VRT élevée, ulcère de jambe ou priapisme). De plus, une analyse en composantes principales n'a permis de déceler aucun sous-groupe de complications vasculaires. Parmi les patients présentant le phénotype clinique « hypervisqueux » (rétinopathie ou ostéonécrose), 78% présentaient au moins une complication « hyperhémolytique ». Une viscosité sanguine plus élevée était associée à la rétinopathie et à l'absence de macroalbuminurie et d'hyperfiltration glomérulaire. L'étude de la fonction microvasculaire, le déficit en *G6PD*, l'alpha-thalassémie n'étaient significativement associés à aucune complication. Le nombre de variants des gènes *BCL11a*, *HBS11-myb 37* et *HBG2* était associé à un taux élevé d'HbF et à l'absence d'ulcères de jambe. Les variants des gènes *HMOX2* et *HMOX1* étaient associés respectivement à l'absence d'ulcères de jambe et à la présence de microalbuminurie.

Conclusion : En accord avec les données précédemment publiées de l'étude CADRE, nous avons constaté que la dichotomie des complications vasculaires « hyperhémolyse » vs « hypervisqueux » n'est pas cliniquement pertinente en Afrique sub-Saharienne. La recherche

d'autres marqueurs simples prédictifs des complications vasculaires est nécessaire pour optimiser le suivi des patients drépanocytaires en Afrique sub-Saharienne.

Mechanistic and biological determinants of sickle cell disease vasculopathy in sub-Saharan Africa: The BIOCADRE study

Brigitte RANQUE^{1,2}, Abdoul Karim DEMBELE^{3,4*}, Mor DIAW^{5,6*}, Claudine LAPOUMEROLIE³, Lucile OFFREDO¹, Oumar TESSOUGUE⁴, Dapa DIALLO⁴, Saliou DIOP⁷, Yves COLIN-ARONOVICZ^{2,3}, Xavier JOUVEN^{1,2}, Olivier BLANC-BRUDE¹, Pierre-Louis THARAUX^{1,2}, Sylvain LE JEUNE^{1,8}, Philippe CONNES^{2,9}, Marc ROMANA^{2,3, *}, Caroline LE VAN KIM^{2,3*}

¹UMR_S970, Université de Paris, Inserm, Paris, France;

²Labex GrEx, université de Paris, France;

³UMR_S1134, Université de Paris, Inserm, Paris, France;

⁴Centre de Recherche et de Lutte contre la Drépanocytose (CRLD), Bamako, Mali;

⁵Laboratoire de Physiologie et Explorations Fonctionnelles, Faculté de Médecine, Pharmacie et Odontologie Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal;

⁶Unité Mixte Internationale (UMI 3189), "Environnement, Santé, Sociétés" CNRS, UCAD, CNRST, USTTB, UGB, Dakar, Sénégal;

⁷Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS), Dakar, Sénégal;

⁸Université des Antilles, Biologie Intégrée du Globule Rouge, UMR_S1134, INSERM, Pointe-à-Pitre, France;

⁹Service de Médecine Interne, Hôpital Avicenne, Bobigny, Assistance-Publique Hôpitaux de Paris, France;

⁹Laboratoire LIBM EA7424, Equipe « Biologie Vasculaire et du Globule Rouge », Université Lyon 1, COMUE, France;

*Equal contributions

Abstract

Background: The CADRE study is a multinational cohort of sickle cell disease (SCD) patients focused on SCD-related vascular organ damages in sub-Saharan Africa. We designed a case-control study nested in this cohort, to investigate new markers of vasculopathy in SCD.

Patients and Methods: adult patients with SS genotype were selected in Dakar and Bamako based on the following complications: tricuspid regurgitant jet velocity (TRV) $>2,5$ m/s (associated with pulmonary hypertension), albuminuria, leg ulcer, priapism, osteonecrosis, retinopathy or none. Echocardiography, laboratory blood and urine tests, blood viscosity measure and peripheral arterial tonometry were performed locally. Saliva DNA was used to genotype known SCD genetic modifiers and candidate genes implicated in hemoglobin catabolism. Statistical associations between these markers, hematological parameters and vascular complications were explored.

Findings: 232 SS patients were analyzable: 58 with high TRV, 45 with osteonecrosis, 43 with priapism, 36 with leg ulcers, 31 with retinopathy and 22 with macroalbuminuria, whereas 28 had no vascular complication. Principal component analysis revealed no cluster of complications. LDH levels were associated with high TRV only, blood viscosity was associated with retinopathy and the absence of macroalbuminuria. Microvascular function measured by peripheral arterial tonometry was not associated with any complication. Genetic variants linked to persistent fetal hemoglobin, were negatively associated with leg ulcers. *HMOX1* and *HMOX2* variants were associated positively with microalbuminuria and negatively with leg ulcers, respectively.

Interpretation: Hyper-hemolytic versus hyper-viscous categorization of patients is not clinically relevant in an African SCD population. New predictive markers of vascular complications are needed to optimize the follow-up of these patients.

Funding: This work was supported by the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm)”, and the “Agence National pour la Recherche (ANR)”; clinical trials.gov identifier NCT03114137. Abdoul Karim Dembélé was supported by a doctoral fellowship from the Fondation Pierre Fabre.

INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) is the most common form of monogenic disease, due to a single mutation in the β -globin gene. Under deoxygenated condition, the abnormal hemoglobin S (HbS) polymerizes and causes the red blood cells (RBCs) to distort into a crescent-like (1). The loss of RBC deformability participates in the occurrence of vaso-occlusion, but other key cellular actors such as vascular endothelium, adherent reticulocytes, neutrophils, monocytes, platelets and mastocytes are involved in the pathophysiology of SCD (2)(3). In addition, chronic hemolytic anemia leads to reduced oxygen-carrying capacity and tissue hypoxia. Increased hemolysis may play a role in progressive multi-organ damages, such as stroke, pulmonary hypertension, kidney disease, leg ulcers and priapism among others. The high inter-individual variability of SCD clinical manifestations is notorious, including in patients of similar genotype. Although both genetic, epigenetic and environmental factors may be involved in this variability (4)(5)(6)(7)(8), very few studies have been conducted in sub-Saharan Africa, where heterogeneous standards of care and insufficient human resources predominate.

Each year, more than 230,000 children with SCD are born in sub-Saharan Africa, compared to 2,600 in North America and 1,300 in Europe (9). In Africa and in India, the numbers of newborns with sickle cell anemia (SCA), the most frequent and severe phenotype due to the homozygous SS genotype, are projected to increase by 30% by 2050. It is estimated that 50 to 90% of these children will die before 5 years of age because of the lack of newborn screening programs and appropriate clinical care (10).

Yet, most clinical studies of SCD chronic complications involve patients living in developed countries, where the socio-economic, environmental and medical contexts are dramatically different from those dwelling in sub-Saharan African countries. We built the CADRE (Coeur, Artères et DREpanocytose) study as a large cohort of SCD patients in five countries of West and Central Africa (Cameroon, Gabon, Cote d'Ivoire, Mali and Senegal), in order to gather reliable data on SCD-related organ damage in sub-Saharan Africa. The main objectives of the cohort were 1) to estimate the incidence of micro- and macrovascular complications of SCD and 2) to identify vascular predictive factors in these countries. Between 2011 and 2013, 3,627 patients aged 3 years and over were included in 5 centers (11)(12).

Basic clinical data obtained during inclusion did not support the hyper-hemolysis paradigm, that stipulates that patients with higher levels of hemolysis would be prone to develop vascular complications like pulmonary hypertension, leg ulcers and priapism, whereas patients with

higher levels of hemoglobinemia (i.e., less hemolysis; “hyper-viscous” phenotype) may have more frequent VOC and acute chest syndrome (ACS), and develop retinopathy and osteonecrosis more frequently (13). However, methodological limitations have also been raised, including a probable mortality bias and questionable reliability of standard hemolytic markers in Africa.

For the 5-years follow-up of the CADRE study, we designed a case-control study nested in the cohort, based on extreme phenotypes of SCD. We aimed to identify biological markers associated with vascular disease, particularly those related to hemolysis. Our project combines an epidemiological approach to identify specific patterns of organ damage with experimental studies based on pathophysiological hypotheses.

Here, we present the general methodology of the study and investigate the association of the main SCD-related chronic complications with microvascular function using peripheral arterial tonometry, blood viscosity, usual plasma markers of hemolysis and variants of candidate genes chosen because of their link to hemolysis or their previously recognized role in the severity of SCD.

PATIENTS AND METHODS

Two centers participating in the CADRE cohort were selected for the BIOCADRE study: the “Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS)” in Dakar, Senegal and the “Centre de Recherche et de Lutte contre la Drépanocytose (CRLD)” in Bamako, Mali. Both are public hospital centers dedicated to the medical care and research in SCD. We first identified subsets of patients within the CADRE cohort, with severe SCA (SS homozygous patients) and specific organ complications: 5 groups of 40 patients (20 in each center) with none or at least one of the following complications at inclusion: tricuspid regurgitant jet velocity (TRV) >2.5 m/s (which may indicate pulmonary hypertension), albuminuria/creatininuria >300 mg/g, leg ulcer, priapism, aseptic osteonecrosis and retinopathy. We also selected patients from both centre without any of the previous complications. Patients with and without vascular complications were within the same range of age (median age [Q1-Q3] of 26 [19-32] and 23 [21-35] years-old, respectively). These 240 patients were recalled for a specific visit in parallel in the two centers.

Patients were investigated at steady state (i.e., 15 days or more after a vaso-occlusive crisis, eight days or more after fever or infectious disease, and three months after the last transfusion).

The visit included a clinical examination and standard laboratory blood and urine tests. The diagnosis of homozygous SCD was confirmed in all patients, using alkaline hemoglobin electrophoresis and/or high-performance liquid chromatography (HPLC). Laboratory tests included complete blood counts (CBC), reticulocyte counts, bilirubin and lactate dehydrogenase (LDH) concentrations in blood, serum and urine creatinine and albumin concentrations. Microalbuminuria and macroalbuminuria were defined by a urinary albumin/creatinine ratio (ACR) > 30 mg/g and >300 mg/g, respectively. Echocardiography was also performed by a trained cardiologist using a predefined protocol, especially to measure TRV. Retinopathy was evaluated in Bamako based on dilated funduscopy, and confirmed by fluorescein angiography if necessary. The diagnosis of leg ulcer and priapism was based on clinical examination. Osteonecrosis was defined on radiological criteria in case of clinical suspicion. Since inflammatory status of African people is supposed to be high, even in healthy individuals, we also recruited 36 healthy individuals living in Bamako, matched on age ± 5 years, in order to interpret more accurately the experimental results. Control participants were recruited from the medical staff or among the siblings of patients and were excluded if they were taking anti-inflammatory or aspirin therapy.

The following experiments were also performed in African centers by local investigators trained by the French teams both on site and in France:

- Isolation of microparticles immediately after blood sampling by successive centrifugations, followed by storage at -80°C (14)
- Measurement of blood viscosity with fresh blood samples using a cone-plate viscometer (Pro DV-II+, with CPE40 spindle; Brookfield, Middleboro, MA) at native hematocrit, 37°C and several shear rates (4.5; 11.5; 22.5; 45; 90 and 225)
- Non invasive microcirculation functional study using peripheral arterial tonometry (EndoPAT2000®, Itamar Medical Ltd, Israel), by measuring changes in digital pulse volume during reactive hyperemia. Low scores of the Reactive Hyperemia Index (RHI), an endothelial vasodilatation marker, reflected impaired endothelial function. The reactive endothelial response was measured in a quiet room in low light at a recommended temperature between 20 - 25°C .
- Additional plasma samples were stored at -80°C and shipped to Paris at mid-term and at the end of the study.
- Saliva was collected for each subject in all-in-one systems dedicated to the stabilization and transportation of saliva DNA (OraGENE-DNA®).

Using DNA extracted from saliva following the provider instructions, we genotyped several candidate genes known to be associated with the degree of SCD severity, as well as genes involved in hemolysis:

- known SCD genetic modifiers (alpha thalassemia, G6PD deficiency (rs1050828, rs1050829, Betica variant), genetic variants related to fetal hemoglobin levels: *HBG2* (rs7482144), *BCL11A* (rs4671393) and *HBS1L-MYC* (rs28384513, rs9399137, rs4895441)
- genes implicated in the catabolism of hemoglobin and inflammation: *HMOX1* (heme oxidase-1), *HMOX2*, *Duffy* gene encoding the DARC protein (Duffy antigen/receptor for chemokine; rs2814778, rs12075).

DNA genotyping was performed using either multiplex GAP PCR for alpha-globin gene (15), or multiplex SNaPshot single-nucleotide primer extension.

All subjects included in the study signed an informed consent form prior to the study. Relevant national ethics committees in each of the participating countries approved the BIOCADRE protocol: Mali (008/MSHP-CNESS/2014), and Senegal (35/MSAS/DPRS/CNERS).

Statistical methods

The description of the investigated parameters was made in the whole population studied, by country and by complication group: percentage for the qualitative variables, and median (interquartile range) for the quantitative variables. The distributions of the quantitative biological parameters were analyzed and log-transformed if necessary, to obtain a normal distribution. Genotyping of allelic variants was encoded as dominant, recessive or codominant according to their known effects in the literature.

Potential clusters of clinical complications, biomarkers and vaso-reactivity index (RHI) were first assessed statistically by principal component analysis. Then, multivariate logistic regressions assessed the potential association between each marker and the presence of each vascular complication or group of complications, with adjustment for age, sex and center. Correlations between the rates of different markers and conventional biological parameters, including hemolytic parameters and blood counts, were performed by non-parametric Spearman test and linear regression for multivariate analyses. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. All analyses were two-sided and conducted using R version 3.5.2.

RESULTS

We recalled 240 patients selected 5 years after their first visit: out of those, 38 could not be traced, 21 died, 62 developed at least one additional complication, and only 15 remained free of complication. We therefore selected 56 additional patients in order to obtain at least 30 patients in each group. Finally, 237 SS adult patients were investigated and biological samples of 232 patients were analyzed in France, including 106 from Bamako and 126 from Dakar (see the flow chart in Figure 1).

Clinical and biological characteristics of the 232 included patients are reported in Table 1. Their average age was 28.8 years (\pm 11.0). A high TRV (>2.5 m/ s) was present in 58 of these patients, aseptic osteonecrosis in 45, priapism in 43, leg ulcers in 36, macroalbuminuria in 33, and retinopathy in 31, whereas 28 patients had none of these vascular complications.

Principal component analysis of the whole cohort failed to reveal a cluster of complications (Figure 2). For example, 78% patients exhibiting a “hyper-viscous” phenotype (retinopathy OR osteonecrosis) also had at least one “hyper-hemolytic” complication (high TRV, albuminuria, leg ulcer or priapism). Conversely, 49% patients with a “hyper-hemolytic” phenotype also had at least one “hyper-viscous” complication (Figure 3).

We did not detect any difference in endothelial vaso-reactivity between SCD patients and healthy controls, but blood viscosity was found to be lower at all shear rates in SCD patients, as expected (Table 2).

The association between the various SCD related-vascular complications and the markers that we investigated is depicted in Table 3. Although high levels of LDH were associated with high TRV, neither LDH nor bilirubin levels were associated with the other complications usually assigned to the “hyper-hemolytic” phenotype (pulmonary hypertension, priapism or leg ulcer without osteonecrosis or retinopathy). Nevertheless, this “hyper-hemolytic” phenotype was negatively associated with hemoglobinemia levels.

Blood viscosity was positively associated to the presence of retinopathy (adjusted OR 3.4 [1.09;12.03], p value 0.043 at RPM5) and negatively associated to macroalbuminuria (adjusted OR 0.22 [0.04;0.91], p value 0.050 at RPM5) and glomerular hyperfiltration (eGFR >160 ml/min, adjusted OR 0.01 [0;0.4], p value 0.031 at RPM5).

The microvascular function assessed by peripheral arterial tonometry was not associated to any of the selected complications (data not shown).

The distribution of the genetic variants investigated in this study is detailed in Supplemental Table 1. The number of genetic variants associated with fetal Hb levels (*BCL11a*; *HBS11 myb 37*; *HBG2*) was significantly associated with the percentage of fetal Hb measured by Hb electrophoresis (Figure 4).

The associations between SCD-related vascular complications and the selected genetic variants are depicted in Table 4. The number of genetic variants associated to fetal Hb persistence (*BCL11a*; *HBS11 myb 37*; *HBG2*) was significantly associated to a lower prevalence of leg ulcers (OR=0.63 [0.4-0.99]).

The presence of a variant allele in the *HMOX2* gene was significantly associated to the absence of leg ulcers (OR= 0.21 [0.03;0.87], p=0.05). The presence of an allelic variant of the *HMOX1* gene was associated with microalbuminuria (OR= 2.89 [1.13;8.27], p =0.034).

No association was found between the clinical vascular complications and the G6PD deficiency, alpha-thalassemia (one or two deleted genes), the *Duffy* gene or the *APOL1* high risk variants (G1/G2 compound heterozygosity or G1 homozygosity or G2 homozygosity).

DISCUSSION

The extreme variability of the clinical expression of SCD in patients has been known for decades. Our pioneering study produced the first clinical report with a fine characterization of vascular complications in a large cohort of SCA patients in Africa.

We asked whether patients could be better clustered, and whether markers identified sub-groups with specific manifestations or increased severity. We opposed phenotypes of disease severity to phenotypes of hemolysis, and we discussed these phenotypes in the light of two sets of data: one set of clinical vascular tests (echocardiographic, functional) and one of biological analyses (blood tests, genetic variant and rheology).

Clustering patients based on VASCULAR EXPLORATION

The BIOCADRE data confirmed observations made in the CADRE study using cross-sectional patient inclusion data (13): it failed to detect any cluster of patients based on types of vascular complications. Moreover, the extent of vasomotor reactivity in fingertips did not associate with specific clinical complications. In fact, endothelial-dependant microvascular dilatation was identical in SCA patients and healthy controls, with RHI medians of 1.43 and 1.38, respectively.

However, control values in Bamako were unexpectedly low, compared to standards in Western countries ($RHI > 1.67$ in controls). Of note, measurements were unfortunately performed at elevated ambient temperature in Bamako (30 to 32°C), which may result in increased vasodilation in steady state, close to maximal vasodilation in patients and controls, thereby hiding potential differences at lower temperatures. Nevertheless, these observations in SCA patients match the only other publication reporting RHI data in SCD, with a $RHI < 1.67$ (connoting endothelial dysfunction) in two third of 36 pediatric patients from the Western world (32).

Clustering patients based on HEMOLYSIS

The BIOCADRE data failed to support the “hyper-hemolysis paradigm” previously proposed by Kato et al.(16). We did find an association between plasma LDH levels and the occurrence of high TRV, as reported in previous studies (17)(18). It suggested a link between hemolysis and a little-specific surrogate marker for pulmonary hypertension (19). However, LDH levels were neither associated with other “hyper-hemolytic” complications, nor inversely associated with “hyper-viscous” complications. Other plasma markers of hemolysis did not correlate with a history of vascular complications. We concluded that a clear dichotomy between “hyper-hemolytic” and “hyper-viscous” phenotypes, based on classical markers of hemolysis, does not seem relevant in sub-Sahara African populations with severe SCD.

One explanation may be that hemolytic markers like LDH are sensitive to infectious diseases (viral hepatitis, malaria) and lose specificity in African populations where the infectious burden is high. BIOCADRE patients were included without overt clinical sign of infection, but the presence of subclinical infection (eg. parasitemia) was not verified because of limited resources available. This will be the focus of future studies. Interestingly, the levels of Hb *per se* were positively significantly associated with hyper-viscous complications (retinopathy or osteonecrosis) and negatively with the occurrence of « hyper-hemolytic » complications (high TRV and/or leg ulcer or priapism) and the presence of micro- or macroalbuminuria.

Clustering patients based on RHEOLOGY

In BIOCADRE, the positive association identified between blood viscosity and sickle cell retinopathy agrees with previous reports in patients with homozygous SCD (27) (28) or sickle cell-hemoglobin C disease (28). This association also supports the conclusion that high hemoglobin levels (main determinant of blood viscosity) are associated with sickle cell

retinopathy (29). In addition, our results confirm a previous study showing a negative association between blood viscosity and macro-albuminuria (30). However, blood viscosity was not inversely correlated to complications commonly associated to “hyper-hemolysis”, nor positively correlated to osteonecrosis as previously shown by our group in an Antillean cohort (31).

Clustering patients based on GENE VARIANTS

The variability in the clinical expression of SCD has also been linked to gene modifiers (5). Those related to anemia and fetal Hb expression are the best documented (6) (20) (8). However, candidate genes connected to hemolysis could not fully explain the diversity in our BIOCADRE phenotypes. Only variants of genes associated with the persistence of fetal Hb and heme-oxygenase expression were statistically associated with clinical complications: the presence of at least one variant among the 3 genes associated with the persistence of fetal Hb was associated with a lower risk of leg ulcers, *HMOX1* variant was associated with microalbuminuria and *HMOX2* variant was associated with the absence of leg ulcer.

Regarding gene *Duffy*, no association with vascular complications was found, but the vast majority of patients (96%) had a silent variant (no DARC protein expression in RBCs). Similarly, G6PD deficiency was rare (4%) and only one patient was homozygous for the alpha-thalassemic mutation, which conferred very low statistical power to these analyses. In contrast, 25% patients had a single deletion among the 4 genes encoding alpha-globin. Alpha-thalassemia has previously been shown to associate with lower severity in SCD (8,15,21). Low alpha-thalassemia representation in BIOCADRE may thus reflect our selection bias for severe patients with complications.

The risk alleles of the *APOLI* gene were not significantly associated with micro- or macroalbuminuria, impaired renal function (eGFR < 60ml/min), or other vascular complications. Of note, only 7 patients (3%) had an eGFR < 60ml/min, so the study was not powerful enough to assess determinants of kidney failure. The absence of association between *APOLI* variants and albuminuria may also be explained by a lack of statistical power (22–25) since the effects of G1 and G2 were only significant using a recessive model in most published studies (22–25), whereas only 13 patients (5.6%) in our study had two G1 or G2 variants of *APOLI* (compound heterozygosity or homozygosity). In addition, conflicting results have been published: while both APOL1 G1 and G2 alleles are at risk in most studies, a pediatric study in the USA found that the G2 allele had a protective effect on albuminuria (26).

DNA samples collected during this study, combined with the detailed patient characteristics, represent powerful material that will be analyzed in the future, using collaborative whole genome sequencing techniques. Such approaches could allow the identification of other genetic variants associated with vascular complications, most probably those associated with strong genetic effects due to moderate sample size.

We acknowledge several weaknesses in our study. Sample size was designed to prove a difference of at least 1 standard deviation of the biological quantitative values between patients presenting a clinical condition, or none: at least 30 patients with each specific condition were required. Therefore, the number of biological samples was high considering the feasibility of sophisticated experiments requiring stable and homogeneous experimental conditions. But sample size was rather small for strong statistical correlation analyses. Furthermore, most patients had not only one, but several vascular complications, which reflects the physiological situation of adults with SCD in Africa. We tried to select the oldest possible patients without any clinical complication, but they were frequently quite younger than the other patients (mean age 22 vs 29 years old). This bias is most probably due to the severity of SCD in Africa. To overcome this problem, we adjusted our statistical analyses for age. Although the mean age was similar in both centers, we observed differences in the prevalence of some clinical complications between the two centers. We performed separate sensitivity analyses in each country and adjusted our tests to the center in order to avoid a recruiting bias.

We had to deal with some missing data due to technical issues that could not be solved before the end of the study, e.g. the evaluation of retinopathy (100% missing data in Dakar), TRV (15% missing data in Bamako) and microalbuminuria (33% missing data in Dakar).

Plasma sample storage at -80°C was also at high risk, as African research centers are frequently subjected to electric power failure. To minimize this risk, we regularly shipped frozen samples to France. Sample transport was also at high risk of dry ice shortage. We shipped dry ice from France and shipped the parcels back immediately after sample collection from the African centers. The customs delays added to the risk of losing entire batches. Fortunately, no sample was lost or thawed, and experimental procedures were performed according to the highest standards. The samples from healthy individuals were stored, shipped and sent in the same conditions.

Our study encompasses many unique features and strengths. First, the large and multinational CADRE cohort proved to be an advantage to pre-screen SCD patients with extreme phenotypes, which represented good candidates for distinct biological patterns. Second, this study is, to our

knowledge, the first to conduct highly sophisticated experiments with SCD patients that actually live in sub-Saharan Africa. Some of these measurements were performed locally, thanks to long-term collaborations with the two African teams which participated in the CADRE study. Clinician investigators were trained both locally and in France for several months and they were able to conduct the experiments on fresh blood samples quickly in their centers, despite numerous logistics limitations.

CONCLUSION

The BIOCADRE study revealed novel characteristics of SCD that may be specific to the African context. The dichotomization of vascular complications into hyper-hemolytic and hyper-viscous subgroups did not prove clinically relevant in Africa. BIOCADRE questions the relative meaning of datasets acquired with patients living in Africa versus Antillean, European and Western world cohorts. Moreover, it remains unclear whether measurements of blood viscosity, microvascular function, or the detection of allelic variants can ultimately facilitate the segmentation of SCD patients into clinically relevant subgroups. New predictive markers of vascular complication are needed to optimize the follow-up of SCD patients.

References

1. Ingram VM. A Specific Chemical Difference Between the Globins of Normal Human and Sickle-Cell Anæmia Hæmoglobin. *Nature*. oct 1956;178(4537):792-4.
2. Kaul DK, Finnegan E, Barabino GA. Sickle red cell-endothelium interactions. *Microcirc N Y N* 1994. janv 2009;16(1):97-111.
3. Allali S, Maciel TT, Hermine O, de Montalembert M. Innate immune cells, major protagonists of sickle cell disease pathophysiology. *Haematologica*. févr 2020;105(2):273-83.
4. Mekontso Dessap A, Contou D, Dandine-Roulland C, Hemery F, Habibi A, Charles-Nelson A, et al. Environmental Influences on Daily Emergency Admissions in Sickle-Cell Disease Patients: *Medicine (Baltimore)*. déc 2014;93(29):e280.
5. Nagel RL, Fabry ME, Pagnier J, Zohoun I, Wajcman H, Baudin V, et al. Hematologically and Genetically Distinct Forms of Sickle Cell Anemia in Africa: The Senegal Type and the Benin Type. *N Engl J Med*. 4 avr 1985;312(14):880-4.
6. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MAC, Araujo AS, Uda M, Sanna S, et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci*. 19 août 2008;105(33):11869-74.

7. Bae HT, Baldwin CT, Sebastiani P, Telen MJ, Ashley-Koch A, Garrett M, et al. Meta-analysis of 2040 sickle cell anemia patients: BCL11A and HBS1L-MYB are the major modifiers of HbF in African Americans. *Blood*. 30 août 2012;120(9):1961-2.
8. Habara A, Steinberg MH. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. *Exp Biol Med*. avr 2016;241(7):689-96.
9. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *The Lancet*. janv 2013;381(9861):142-51.
10. Grosse SD, Odame I, Atrash HK, Amendah DD, Piel FB, Williams TN. Sickle cell disease in Africa: a neglected cause of early childhood mortality. *Am J Prev Med*. déc 2011;41(6 Suppl 4):S398-405.
11. Ranque B, Menet A, Boutouyrie P, Diop IB, Kingue S, Diarra M, et al. Arterial Stiffness Impairment in Sickle Cell Disease Associated With Chronic Vascular Complications: The Multinational African CADRE Study. *Circulation*. 27 sept 2016;134(13):923-33.
12. Ranque B, Menet A, Diop IB, Thiam MM, Diallo D, Diop S, et al. Early renal damage in patients with sickle cell disease in sub-Saharan Africa: a multinational, prospective, cross-sectional study. *Lancet Haematol*. nov 2014;1(2):e64-73.
13. Dubert M, Elion J, Tolo A, Diallo DA, Diop S, Diagne I, et al. Degree of anemia, indirect markers of hemolysis, and vascular complications of sickle cell disease in Africa. *Blood*. 16 nov 2017;130(20):2215-23.
14. Lacroix R, Judicone C, Mooberry M, Boucekine M, Key NS, Dignat-George F, et al. Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost*. juin 2013;11(6):1190-3.
15. Nebor D, Broquere C, Brudey K, Mougengel D, Tarer V, Connes P, et al. Alpha-thalassemia is associated with a decreased occurrence and a delayed age-at-onset of albuminuria in sickle cell anemia patients. *Blood Cells Mol Dis*. 15 août 2010;45(2):154-8.
16. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*. janv 2007;21(1):37-47.
17. Kato GJ, McGowan V, Machado RF, Little JA, Taylor J 6th, Morris CR, et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*. 15 mars 2006;107(6):2279-85.
18. Aliyu ZY, Gordeuk V, Sachdev V, Babadoko A, Mamman AI, Akpanpe P, et al. Prevalence and risk factors for pulmonary artery systolic hypertension among sickle cell disease patients in Nigeria. *Am J Hematol*. juin 2008;83(6):485-90.
19. Parent F, Bachir D, Inamo J, Lionnet F, Driss F, Loko G, et al. A Hemodynamic Study of Pulmonary Hypertension in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 7 juill 2011;365(1):44-53.

20. Steinberg MH, Adewoye AH. Modifier genes and sickle cell anemia: *Curr Opin Hematol.* mai 2006;13(3):131-6.
21. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. Longo DL, éditeur. *N Engl J Med.* 20 avr 2017;376(16):1561-73.
22. Geard A, Pule GD, Chetcha Chemegni B, Ngo Bitoungui VJ, Kengne AP, Chimusa ER, et al. Clinical and genetic predictors of renal dysfunctions in sickle cell anaemia in Cameroon. *Br J Haematol.* août 2017;178(4):629-39.
23. Zahr RS, Rampersaud E, Kang G, Weiss MJ, Wu G, Davis RL, et al. Children with sickle cell anemia and APOL1 genetic variants develop albuminuria early in life. *Haematologica.* sept 2019;104(9):e385-7.
24. Saraf SL, Zhang X, Shah B, Kaniyas T, Gudehithlu KP, Kittles R, et al. Genetic variants and cell-free hemoglobin processing in sickle cell nephropathy. *Haematologica.* oct 2015;100(10):1275-84.
25. Kormann R, Jannot A-S, Narjoz C, Ribeil J-A, Manceau S, Delville M, et al. Roles of APOL1 G1 and G2 variants in sickle cell disease patients: kidney is the main target. *Br J Haematol.* oct 2017;179(2):323-35.
26. Schaefer BA, Flanagan JM, Alvarez OA, Nelson SC, Aygun B, Nottage KA, et al. Genetic Modifiers of White Blood Cell Count, Albuminuria and Glomerular Filtration Rate in Children with Sickle Cell Anemia. Connes P, éditeur. *PLOS ONE.* 6 oct 2016;11(10):e0164364.
27. Serjeant BE, Mason KP, Acheson RW, Maude GH, Stuart J, Serjeant GR. Blood rheology and proliferative retinopathy in homozygous sickle cell disease. *Br J Ophthalmol.* 1 juill 1986;70(7):522-5.
28. Lemaire C, Lamarre Y, Lemonne N, Waltz X, Chahed S, Cabot F, et al. Severe proliferative retinopathy is associated with blood hyperviscosity in sickle cell hemoglobin-C disease but not in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2013;55(2):205-12.
29. Dembélé AK, Toure BA, Sarro YS, Guindo A, Fané B, Offredo L, et al. Prévalence et facteurs de risque de la rétinopathie drépanocytaire dans un centre de suivi drépanocytaire d'Afrique subsaharienne. *Rev Médecine Interne.* sept 2017;38(9):572-7.
30. Lamarre Y, Romana M, Lemonne N, Hardy-Dessources M-D, Tarer V, Mougénel D, et al. Alpha thalassemia protects sickle cell anemia patients from macro-albuminuria through its effects on red blood cell rheological properties. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2014;57(1):63-72.
31. Lemonne N, Lamarre Y, Romana M, Mukisi-Mukaza M, Hardy-Dessources M-D, Tarer V, et al. Does increased red blood cell deformability raise the risk for osteonecrosis in sickle cell anemia? *Blood.* 11 avr 2013;121(15):3054-6.
32. Sivamurthy KM, Dampier C, MacDermott M, Maureen M, Cahill M, Hsu LL. PERIPHERAL ARTERIAL TONOMETRY IN ASSESSING ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN PEDIATRIC SICKLE CELL DISEASE. *Pediatr Hematol Oncol.* 20 nov 2009;26(8):589-96.

Figure 1 flow chart

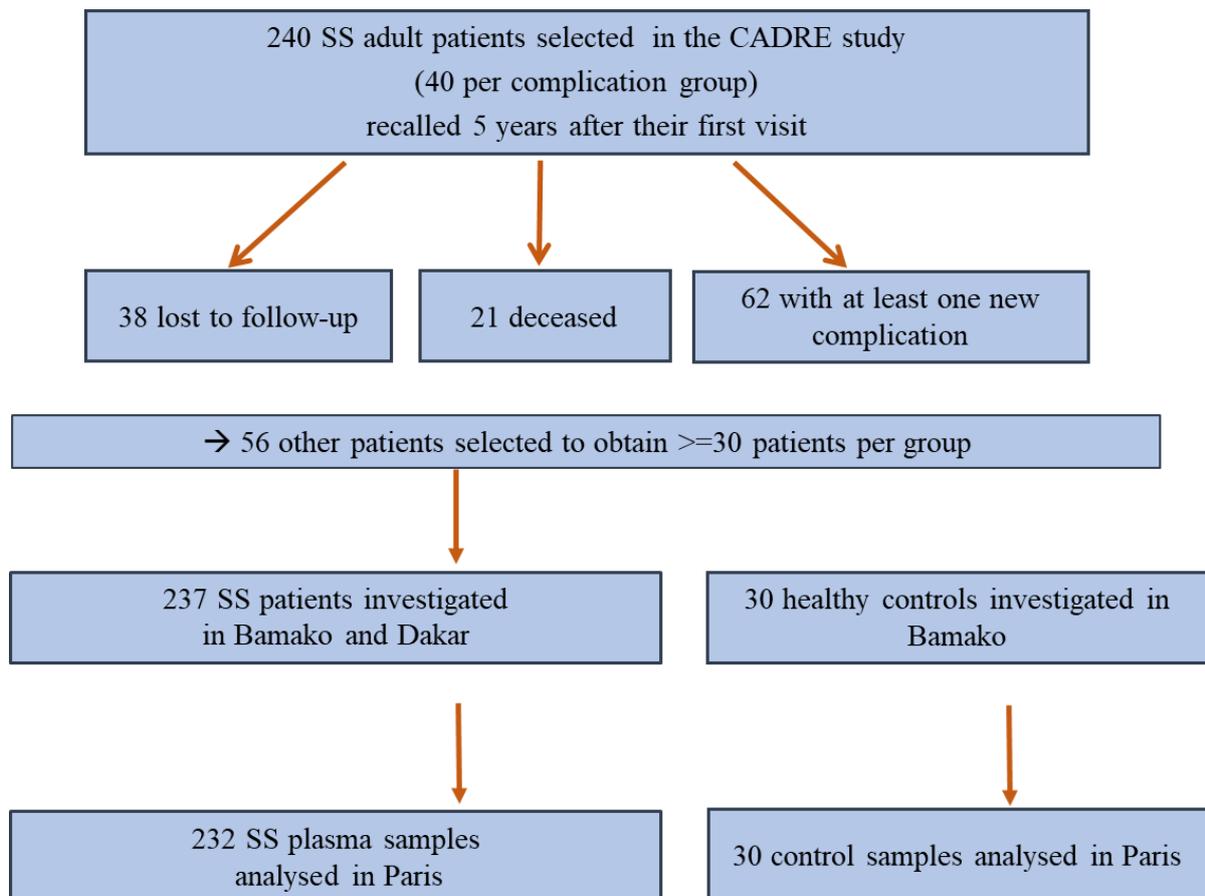


Figure 2: Multiple correspondence analysis of SCD-related vascular complications

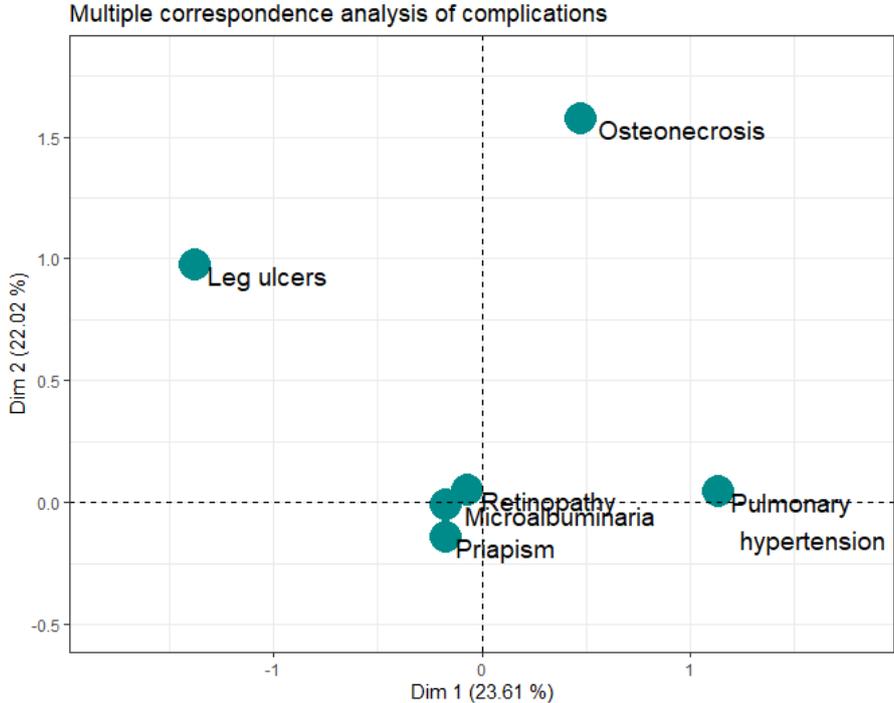
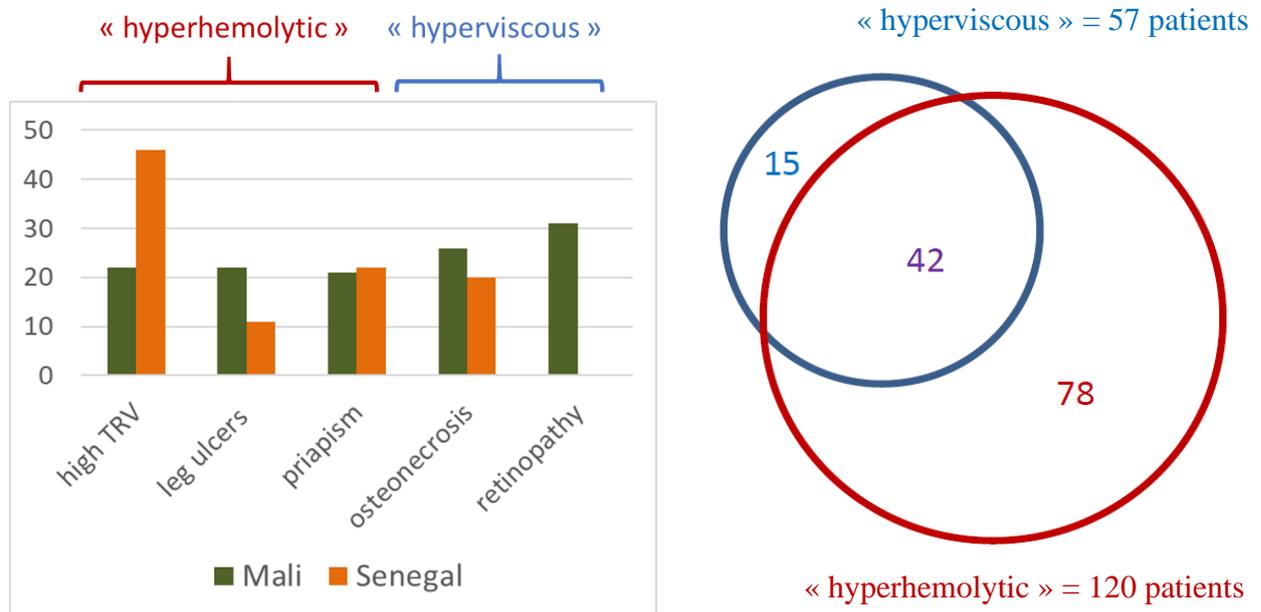


Figure 3: complications classically considered as part of the “hyperhemolytic” and “hyperviscous” sub-phenotypes in the BIOCADRE study



Left panel. Each bar represents the number of patients with a history of SCD-related complication: tricuspid regurgitant jet velocity (TRV)>2.5 m/s, leg ulcer, priapism osteonecrosis, retinopathy, in Bamako (blue) and in Dakar (Red)

Right panel. Number of patients with at least one « hyper-viscous » (blue circle), or hyper-hemolytic (red circle) complication. «hyper-viscous »: osteonecrosis or retinopathy; «hyper-hemolytic»: TRV>2.5 m/s, priapism or leg ulcer.

Figure 3: percentage of fetal Hb according to the number of genetic variants associated with fetal Hb persistence (*BCL11a*; *HBS11 myb 37*; *HBG2*)

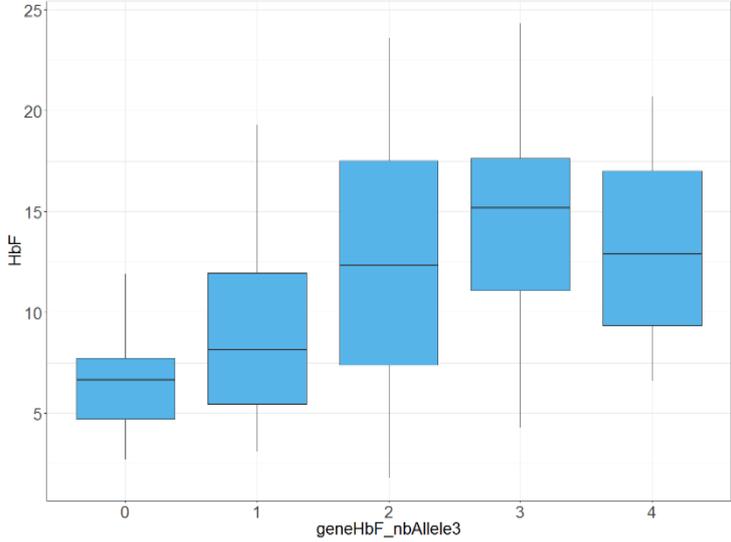


Tableau 1: Clinical and biological characteristics of patients with SCD, selected in Bamako, Mali and Dakar, Senegal

	All N=232	Bamako N = 106	Dakar N = 126
Age (mean, sd)	28.8 (11.0)	28.8 (10.6)	28.0 (11.3)
Female sex	63 (49%)	63 (58%)	53 (41%)
Osteonecrosis	46 (22%)	26 (25%)	20 (19%)
Retinopathy	31 (44%)	31 (44%)	NA
Pulmonary arterial hypertension	58 (27%)	12 (14%)	46 (37%)
Priapism	43 (41%)	21 (50%)	22 (34%)
Leg ulcers	33 (16%)	22 (21%)	11 (10%)
Microalbuminuria	84 (56%)	70 (71%)	14 (28%)
Macroalbuminuria	22 (15%)	17 (18%)	5 (7%)
Glomerular hyperfiltration*	50 (26%)	19 (19%)	31 (34%)
Renal failure**	7 (4%)	2 (2%)	5 (5%)
No vascular complication	36 (16%)	6 (6%)	30 (25%)
Hemoglobin (median, IQR)	8.25 [7.5;9.4]	8.55 [7.80;9.78]	8.09 [7.30;8.89]
Leukocytes (median, IQR)	11.2 [8.9;13.8]	10.7 [8.68;12.6]	12.3 [9.20;15.8]
Platelets (median, IQR)	826 [596;1149]	494 [383;582]	453 [339;512]
Reticulocytes (median, IQR)	270 [200;358]	270 [200;358]	NA
Lactate dehydrogenase (median, IQR)	897 [676;1023]	1097 [776;1438]	659 [504;861]
Fetal hemoglobin % (median, IQR)	10.9 [7.20;15.3]	10.6 [7.40;15.7]	11.2 [6.80;14.0]

* Glomerular hyperfiltration: Estimated glomerular filtration rate (eGFR) >160 ml/min.

** Renal Failure: eGFR < 60 ml/min.

Tableau 2: Endothelium-dependent vaso-reactivity and blood viscosity measured at increasing rates, in healthy subjects versus patients with sickle cell disease living in Bamako

	Patients	Controls	P value
	N=106	N=35	
Age	28.0 [22.0;35.0]	29.0 [22.0;34.0]	0.945
Endothelial vaso-reactivity			
RHI	1.43 [1.29;1.76]	1.38 [1.30;1.48]	0.143
Blood viscosity			
(cP)			
4.5 s⁻¹	11.0 [7.41;16.1]	13.8 [11.8;15.4]	0.013
11.5 s⁻¹	7.10 [5.52;9.57]	8.99 [8.18;10.6]	0.001
22.5 s⁻¹	5.82 [4.96;7.74]	7.84 [6.69;8.60]	<0.001
45 s⁻¹	5.07 [4.25;6.30]	6.23 [5.60;7.12]	<0.001
90 s⁻¹	4.70 [4.09;5.75]	5.62 [5.01;6.09]	0.001
225 s⁻¹	4.41 [3.90;5.25]	4.79 [4.39;5.16]	0.064

RHI: Reactive Hyperemia Index

Tableau 3: Associations between classical blood biomarkers and clinical complications of sickle cell disease: Odds Ratios from multivariate logistic regression analysis with adjustment for age, sex and centre

Complication	Hemoglobin	Bilirubin (log)	LDH (log)	Leucocytes (log)	Fetal hemoglobin (%)	Viscosity (11.5r/s)
osteonecrosis	1.3 [1.0;1.7]	0.9 [0.4;1.8]	0.8 [0.3;1.7]	0.3 [0.1;0.6]	1.05 [0.98;1.13]	1.6 [0.6;4.5]
retinopathy	1.1 [0.71;1.5]	0.8 [0.4;1.7]	1.6 [0.6;4.7]	0.6 [0.1;3.8]	1.01 [0.92;1.11]	3.4 [1.1;12.0]
«hyperviscous»*	1.9 [1.1;3.2]	0.5 [0.2;1.5]	0.9 [0.2;3.4]	0.1 [0;0.6]	1.07 [0.99;1.16]	5.0 [1.4;20.0]
TRV > 2.5 m/s	0.9 [0.7;1.2]	1.4 [0.7;2.7]	2.6 [1.2;6.3]	1.4 [1.0;2.2]	0.89 [0.62;1.08]	1.1 [0.3;3.9]
priapism	0.9 [0.7;1.2]	0.9 [0.4;1.9]	1.1 [0.3;3.3]	0.8 [0.3;1.2]	0.94 [0.87;1.02]	2.7 [0.8;11]
leg ulcers	0.8 [0.6;1.1]	1.2 [0.6;2.5]	1.5 [0.6;3.9]	1.0 [0.4;1.6]	0.85 [0.76;0.94]	0.8 [0.3;2.7]
«hyperhemolytic»	0.8 [0.6;1.0]	1.4 [0.7;2.7]	2.3 [1;5.3]	4 [1.4;12.7]	0.95 [0.84;1.08]	1.83 [0.73;4.65]
microalbuminuria	0.7 [0.5;0.9]	0.8 [0.4;1.6]	1.3 [0.6;2.9]	1.0 [0.5;1.6]	0.91 [0.83;1]	0.9 [0.3;2.4]
macroalbuminuria	0.6 [0.4;0.9]	0.9 [0.3;2.4]	0.6 [0.2;2.1]	1.1 [0.3;2.1]	0.9 [0.78;1.02]	0.2 [0.0;0.9]
Glomerular hyperfiltration*	0.8 [0.5;1.3]	18.3 [4.5-99.2]	0.8 [0.1;4.7]	0.6 [0.17;2.15]	0.86 [0.7;1.02]	0.1 [0;0.9]

TRV: tricuspid regurgitant jet velocity; «hyper-viscous»: osteonecrosis or retinopathy; «hyper-hemolytic»: TRV>2.5 m/s, priapism or leg ulcer.

Glomerular hyperfiltration: estimated glomerular filtration rate (CKEpi formula) > 160 ml/min.

Blood viscosity measured at 11.5 rounds per second

Supplemental Table 1: Genetic variant distribution in the two centers

Gene	SNP	Mali N=106	Senegal N=126
HMOX1:	rs743811		
HM		18 (18.8%)	39 (35.5%)
MM		0 (0.00%)	4 (3.64%)
HMOX2:	rs2071746		
HM		39 (40.6%)	48 (42.9%)
MM		19 (19.8%)	17 (15.2%)
HMOX repetitions			
SL		17 (17.7%)	11 (12.4%)
SS		4 (4.17%)	8 (8.99%)
APOL1 (N of risk alleles)			
1		28 (31.1%)	42 (39.6%)
2		6 (6.67%)	7 (6.60%)
DARC (fyn78)	rs 2814778		
FYa/b	T	3 (3.26%)	5 (4.50%)
FYa-b-	C	89 (96.7%)	105 (94.6%)
G6PD deficiency			
no		91 (94.8%)	111 (97.4%)
yes		5 (5.21%)	3 (2.63%)
Genetic persistence of HbF (N of risk alleles)			
0		7 (7.45%)	3 (2.68%)
1		25 (26.6%)	21 (18.8%)
2		28 (29.8%)	35 (31.2%)
3		34 (36.2%)	53 (47.3%)
Alpha globin			
Gene	SNP	Mali N=106	Senegal N=126
4 alpha genes		72 (74.0%)	85 (73.9%)
3 alpha genes		24 (25.0%)	30 (26.1%)
2 alpha genes		1 (1.0%)	0 (0.0%)

HMOX repetitions: S=short, L= long

APOL1 risk alleles: G1a (rs73885319 G), G1b (rs60910145 G) or G2 (rs71785313 delTTATAA)

G6PD deficiency: rs1050829 C associated with either rs1050828T or betica G.

Genetic persistence of HbF: number of risk alleles for BCL11a (rs 4671393 A), HBS11-myb 37 (rs28384513 G, rs9399137 C, rs4895441 G) and HBG2 (rs 7482144 A) genes.

Tableau 4a: Associations between genetic markers and clinical complications of sickle cell disease: Odds Ratios from multivariate logistic regression analysis with adjustment for age, sex and center

Complication	HMOX1*	HMOX2*	HMOX repet	APOL1 high risk
osteonecrosis	1.32 [0.57;2.94]	1.41 [0.68;3.03]	0.55 [0.23;1.34]	0.73 [0.34;1.58]
retinopathy	1.64 [0.43;6.67]	2.04 [0.71;6.25]	0.75 [0.21;2.73]	1.92 [0.66;5.88]
«hyperviscous»*	2.27 [0.88;6.25]	2.13 [0.95;5.0]	0.75 [0.28;1.97]	1.34 [0.59;3.07]
TRV > 2.5 m/s	0.88 [0.42;1.81]	0.59 [0.3;1.15]	0.66 [0.29;1.55]	0.64 [0.32;1.29]
priapism	1.16 [0.4;3.33]	1.11 [0.47;2.7]	1.05 [0.35;3.23]	1.08 [0.44;2.68]
leg ulcers	0.67 [0.21;1.85]	0.44 [0.18;1.04]	1.53 [0.52;5.62]	1.05 [0.44;2.61]
“hyperhemolytic”	0.42 [0.19;1.10]	0.43 [0.19;0.94]	1.21 [0.5;2.88]	0.82 [0.37;1.81]
microalbuminuria	2.94 [1.15;8.33]	2.0 [0.94;4.35]	1.22 [0.47;3.07]	0.91 [0.41;1.99]
macroalbuminuria	1.43 [0.39;4.76]	3.33 [0.97;14.28]	0.69 [0.21;2.69]	2.22 [0.68;8.69]
Glomerular hyperfiltration	1.25 [0.46;3.33]	0.92 [0.39;2.22]	1.15 [0.38;3.86]	0.5 [0.19;1.26]

*dominant model

APOL1 high risk: G1 and G2 compound heterozygoty, or G1 homozygoty, or G2 versus G1 or G2 heterozygotes, or wild type,

TRV: tricuspid regurgitant jet velocity,

«hyperviscous »: osteonecrosis or retinopathy,

«hyperhemolytic»: TRV>2.5 m/s, priapism or leg ulcer.

Tableau 4b: Associations between genetic markers and clinical complications of sickle cell disease: Odds Ratios from multivariate logistic regression analysis with adjustment for age, sex and center

Complication	DARC Fyn78	G6PD deficit	HbF persistence	Alpha thal
osteonecrosis	0.33 [0.09;1.25]	0.6 [0.03;4.22]	0.9 [0.61;1.33]	1.68 [0.76;3.65]
retinopathy	0.61 [0.02;16.61]	NA	1.2 [0.72;2.01]	0.8 [0.23;2.6]
«hyperviscous»*	0.54 [0.13;2.29]	NA	1.09 [0.71;1.69]	1.05 [0.44;2.49]
TRV > 2.5 m/s	1.06 [0.3;4.82]	0.4 [0.02;2.54]	1.1 [0.75;1.61]	0.61 [0.26;1.32]
priapism	1.32 [0.32;8.8]	1.27 [0.21;7.6]	0.96 [0.59;1.57]	0.68 [0.24;1.84]
leg ulcers	0.34 [0.09;1.51]	3.57 [0.61;19]	0.63 [0.4;0.99]	1.53 [0.57;3.84]
“hyperhemolytic”	0.85 [0.10;5.27]	0.93 [0.16;7.47]	0.74 [0.47;1.15]	0.6 [0.26;1.38]
microalbuminuria	6.47 [0.96;133.1]	3.54 [0.48;73.69]	1.1 [0.73;1.66]	0.96 [0.4;2.34]
macroalbuminuria	0.66 [0.12;11.71]	1.73 [0.08;13.23]	1.01 [0.57;1.86]	0.81 [0.17;2.84]
Glomerular hyperfiltration	1.72 [0.27;37.26]	0.86 [0.04;6.75]	0.64 [0.39;1.02]	1.1 [0.43;2.69]

TRV: tricuspid regurgitant jet velocity;

«hyperviscous »: osteonecrosis or retinopathy;

«hyperhemolytic»: TRV >2.5 m/s, priapism or leg ulcer

HbF persistence: at least one allele at risk among BCL11a (rs 4671393 A) , HBS11-myb 37 (rs28384513 G, rs9399137 C, rs4895441 G) or HBG2 (rs 7482144 A) genes

1.2. Article 2 : Cell-Derived Microparticles and Sickle Cell Disease Chronic Vasculopathy in sub-Saharan Africa: a multinational Study

Résumé : Microparticules cellulaires et vasculopathie chronique drépanocytaire en Afrique sub-Saharienne: une étude multinationale

Contexte : La participation des MPs dans la pathophysiologie de la drépanocytose est bien établie. Cependant la pertinence clinique des MPs comme marqueurs et/ou comme acteurs des différentes complications vasculaires n'a pas été pleinement élucidée et n'a jamais été explorée dans un contexte d'Afrique subsaharienne. Dans cette étude, nous avons étudié pour la première fois le profil des MPs des patients SS vivant dans les pays d'Afrique subsaharienne et nous nous sommes interrogés sur le fait que les MPs d'origine érythrocytaires pourraient constituer des biomarqueurs de certaines complications chroniques. Afin de connaître le statut des MPs dans la population non drépanocytaire, nous avons étudié la distribution de leurs origines dans un groupe témoin AA dans cette région.

Patients et méthode : A travers une étude cas-témoins transversale, nichée dans la cohorte CADRE (identifiant clinique trial.gov NCT03114137), nous avons inclus 232 adultes SS dans deux centres africains : Bamako (Mali) et Dakar (Sénégal). Les patients ont été sélectionnés selon la présence ou l'absence d'au moins une des complications suivantes: vitesse de régurgitation tricuspидienne (VRT) > 2,5 m/s (paramètre échographique de l'hypertension pulmonaire), microalbuminurie, ulcère de jambe, priapisme, ostéonécrose aseptique et rétinopathie. Les patients ont été recrutés à l'état basal (c'est-à-dire au moins 15 jours après une crise vaso-occlusive, 8 jours après une fièvre ou une maladie infectieuse et 3 mois après une transfusion). Nous avons également recruté 36 sujets adultes normaux, appariés selon l'âge et le sexe à Bamako. Pour chaque prélèvement nous disposons : d'un hémogramme, de marqueurs d'hémolyse (réticulocytes et taux de LDH) et du bilan rénal. Les MPs ont été isolés dans les centres africains immédiatement après le prélèvement sanguin par centrifugations successives, puis stockées à -80 ° C. La quantification et l'origine cellulaire des microparticules ont été déterminées par cytométrie en flux à l'Institut national de transfusion sanguine à Paris.

Résultats : Parmi les 232 patients, on retrouve une VRT élevé n = 58, une microalbuminurie n = 84, un ulcères de jambe n = 33, un priapisme n = 43, une ostéonécrose aseptique n = 46 et une rétinopathie n = 31 et 36 patients sans complication à l'inclusion. Les MPs érythrocytaires étaient largement prédominantes chez les patients SS comparés aux témoins. Les MPs érythroïdes (érythrocytes et réticulocytes) étaient inversement corrélées à la rétinopathie (p = 0,022; p = 0,00, respectivement). Les MPs de réticulocytes étaient inversement corrélées aux antécédents de priapisme (p = 0,020) et positivement corrélées aux ulcères de jambe (p = 0,041). Aucune corrélation n'a été trouvée entre les MPs d'autres origines cellulaires et complications chroniques, à l'exception d'une association négative entre les MPs endothéliales et le priapisme (p = 0,042).

Conclusion : Cette étude décrit pour la première fois les profils de MPs plasmatiques des sujets sains et de patients drépanocytaires avec diverses complications vasculaires

chroniques, vivant en Afrique subsaharienne. Nos résultats indiquant une corrélation non absolue entre les MPs érythroïdes et les complications hémolytiques. Ce qui est en accord avec la faible pertinence du paradigme de hyperhémolyse vs l'hyperviscosité en Afrique sub-Saharienne.

ARTICLE 2

British Journal of Haematology



Cell-Derived Microparticles and Sickle Cell Disease Chronic Vasculopathy in sub-Saharan Africa: a multinational Study

Journal:	<i>British Journal of Haematology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Ordinary Papers

Article en révision

1
2
3 **Cell-Derived Microparticles and Sickle Cell Disease Chronic Vasculopathy in sub-**
4 **Saharan Africa: a multinational Study**
5
6
7

8 Abdoul Karim DEMBELE^{1,2,3,4*}, Claudine LAPOUMEROULIE^{1,2,3*}, Mor DIAW^{5,6*}, Oumarou
9 TESSOUGUE⁴, Lucile OFFREDO^{3,7}, Dapa DIALLO⁴, Saliou DIOP⁸, Jacques ELION^{1,2,3},
10 Yves COLIN-ARONOVICZ^{1,2,3}, Pierre-Louis THARAUX^{3,7}, Xavier JOUVEN^{3,7}, Marc
11 ROMANA^{3,9*}, Brigitte RANQUE^{3,7*}, Caroline LE VAN KIM^{1,2,3*}
12

13 *Equal contribution
14

15 ¹Université de Paris, UMR_S1134, BIGR, Inserm, F-75015 Paris, France; ²Institut National de
16 Transfusion Sanguine, F-75015 Paris, France; ³Laboratoire d'Excellence GR-Ex; ⁴Centre de
17 Recherche et de Lutte contre la Drépanocytose (CRLD), Bamako, Mali; ⁵Université Cheikh
18 Anta Diop de Dakar (UCAD), Laboratoire de Physiologie et Explorations Fonctionnelles,
19 Dakar, Sénégal; ⁶Unité Mixte Internationale (UMI 3189), "Environnement, Santé, Sociétés"
20 CNRS, UCAD, CNRST, USTTB, UGB, Dakar, Sénégal ; ⁷Université de Paris, Inserm, Paris
21 Cardiovascular Centre - PARCC, F-75015 Paris, France ; ⁸Centre National de Transfusion
22 Sanguine (CNTS), Dakar, Sénégal. ⁹Université des Antilles, Biologie Intégrée du Globule
23 Rouge, UMR_S1134, BIGR, Inserm, F-97157, Pointe-à-Pitre, France
24
25
26
27
28
29
30
31

32 Corresponding author:

33 Caroline LE VAN KIM, Université de Paris, UMR_S1134, Biologie Intégrée du Globule
34 Rouge, Inserm, F-75015 Paris, France; Institut National de Transfusion Sanguine, 6 rue
35 Alexandre Cabanel 75739 Paris France; email: caroline.le-van-kim@inserm.fr
36
37

38 ORCID: Researcher ID: <https://orcid.org/0000-0002-3251-1310>
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Although most individuals with sickle cell disease live in sub-Saharan Africa, the natural history of the disease on this continent remains largely unknown. Intravascular haemolysis results in the activation of circulating blood cells and the release of microparticles (MPs) which exert pro-inflammatory effects and contribute to vascular damage. We designed a case-control study nested in the CADRE cohort and based on extreme phenotypes, to analyse blood cell-derived MPs in 232 SS adult patients at steady state, followed in Bamako and Dakar centres. Thirty-six healthy adult controls matched by age-and sex were recruited in Bamako.

The MPs concentrations were higher in SS patients compared to AA controls with a large predominance of erythrocyte- and reticulocyte-derived MPs. These erythroid-derived MPs were significantly lower in patients with retinopathy ($p=0.022$). Reticulocyte-derived MPs were significantly negatively and positively associated with a history of priapism ($p=0.020$) and leg ulcers ($p=0.041$), respectively.

We describe for the first time the comparative patterns of plasma MPs in healthy subjects and sickle patients living in sub-Saharan Africa and exhibiting various complications. Our results indicating an absence of a clear correlation between erythroid MPs and haemolytic complications agree with the weak relevance of the hyperhaemolysis *vs* hyper viscous paradigm in Africa.

Key words: sickle cell anaemia, vascular complications, microparticles, sub-Saharan Africa

INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) is considered as the most common monogenic disease worldwide. It is estimated that 25 million people suffers from SCD, including 15 million in sub-Saharan Africa, and its incidence is expected to increase to 400,000 neonates born per year by 2050(1).

SCD results from a single-nucleotide substitution (HBB: c.20A.T (p. Glu7Val)), that affects the sixth amino acid of the mature β globin chain and leads to the abnormal haemoglobin S (HbS). Upon deoxygenation, HbS polymerizes and promotes sickling of erythrocytes(2) leading to major red blood cell (RBC) dysfunction, but vascular endothelial cells, leukocytes, neutrophils, monocytes, and platelets also represent key factors in the pathophysiology of the disease(3).

Repeated acute ischemic and vaso-occlusion events occur due to the RBC sickling in the microcirculation, leading to endothelial dysfunction and vasculopathy, which in turn results in chronic organ damages. Patients with SCD have an increased risk of stroke, pulmonary arterial hypertension, nephropathy, retinopathy and osteonecrosis of large joints which may be due to vascular occlusion. Complications were classified into two sub-phenotypes, i.e. “hyperhaemolysis-endothelial dysfunction” and “high haemoglobin-hyperviscous”, according to their association with anaemia level and haemolysis markers expression or blood viscosity respectively(4).

Patients with SCD exhibit alterations in platelet function, as well as changes in the pro/anticoagulant, and fibrinolytic systems toward a procoagulant phenotype(5). Moreover, SCD is also referred as a chronic inflammatory disease involving chronic haemolysis and the presence of circulating cell-derived microparticles (MPs)(6). MPs are submicrometric vesicles (0.1 to 1 μm) shed from the remodelling of plasma membrane in response to cell activation and apoptosis. Intricated pathophysiological pathways in SCD result in the

activation of endothelial and circulating blood cells and the release of MPs that mainly originate from activated platelets, erythrocytes and endothelial cells(7). Previous studies have reported an increase of circulating MPs concentration in SCD adults at steady state compared to healthy controls, as well as during vaso-occlusive crisis(8). To date, the clinical relevance of MPs in SCD has not been fully elucidated nor explored in a sub-Saharan African context. In this study, we studied for the first time MPs profile of sickle cell anaemia (SCA) patients, i.e. SS genotype, living in sub-Saharan African countries and we investigated if blood-cell-type-derived MPs could constitute biomarkers of chronic complications. We conducted a cross-sectional study named BIOCADRE, nested in the CADRE cohort (Coeur-Artère-Drépanocytose, clinical trials.gov identifier NCT03114137). The CADRE study was built as a large cohort of SCD patients in five countries of West and Central Africa (Cameroon, Gabon, Cote d'Ivoire, Mali and Senegal), in order to gather reliable data on SCD-related organ damage. Between 2011 and 2013, 3,627 patients were included in 5 centres(9):(10) and for the 5-years follow-up of the CADRE study, we designed the BIOCADRE case-control study nested in the cohort, based on extreme phenotypes of SCD.

METHODS

Study design and patients

Patients were recruited in two African centres from the CADRE study, the “Centre de Recherche et de Lutte contre la Drépanocytose” (CRLD) in Mali and the “Centre National de la Transfusion Sanguine” (CNTS) in Senegal. We identified subsets of patients within the CADRE cohort with specific organ complications and included 232 adults with SS genotype, in Bamako (n = 106) and Dakar (n = 126). Patients were within the same range of age (median age [Q1-Q3] of 26 [19-32] and 23 [21-35] years-old, respectively). These 232 patients were recalled for a specific visit at steady state in parallel in the two centres.

Patients were investigated at steady state (i.e., 15 days after a vaso-occlusive crisis, 8 days after fever or infectious disease, and three months after the last transfusion). In each centre, the diagnosis of SCD was confirmed in all patients, using haemoglobin (Hb) electrophoresis and/or high-performance liquid chromatography (HLPC). Laboratory tests included blood counts (CBC), reticulocyte counts, bilirubin and lactate dehydrogenase (LDH) concentrations in blood, serum creatinine concentration, urine creatinine concentration, and were recorded for all patients. The tricuspid regurgitant jet velocity (TRJV) > 2.5 m/s (which may indicate pulmonary hypertension) was measured by echocardiography. Microalbuminuria was defined by measuring the albuminuria/creatininuria ratio (ACR) > 30 mg/g. Retinopathy was based on the dilated-pupil fundus examination and confirmed by fluorescein angiography if necessary. The diagnosis of leg ulcer and priapism was based on clinical examination or questioning about medical history. Osteonecrosis was defined on the radiography performed in case of clinical suspicion. Patients were stratified depending on the absence or the presence of at least one of these six complications previously described, or no complications at the time of the sampling. We also recruited 36 age- and sex-matched

healthy adults as controls enrolled at the CRLD in Bamako. None of the control participants were undergoing anti-inflammatory or aspirin therapy. Relevant national ethics committees in each of the participating countries approved the BIOCADRE protocol: Mali (008/MSHP-CNESS/2014), and Senegal (35/MSAS/DPRS/CNERS). Study was conducted according to the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all participants prior to the study.

Biochemistry analysis

Peripheral blood samples were collected on ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) (1.2 mg/mL) for complete blood count. For chemical analysis, clotted samples were obtained, and serum was separated by centrifugation at 20°C for 15 min at 1 000 g.

Microparticle preparation and analysis

MPs preparation and analysis were performed following the recommendations of the International Society of Thrombosis and Hematology(11).

- Prior logistic and isolation of microparticles (MPs):

a. MPs should be isolated in a very short time after blood collection. Due to the African context (large number of patients examined in a journey, elevated ambient temperature, scarcity of ice supplies), this pre-analytical step was challenging. To carry out this study, we previously equipped the two African centres of required materials for the isolation of MPs, mainly high-speed centrifuges but also freezer at -80°C. In order to have consistent procedures in the two centres, we trained in Dakar, Bamako and Paris the clinicians in charge of the patients before the beginning of the recruitment. Finally, the transportation of MPs between Africa and Paris was carried out in dry ice with a stringent control of cold chain management.

b. Venous blood was collected from the antecubital vein and collected into 3.2% trisodium citrate tubes (BD Vacutainer, Plymouth, UK). MPs were isolated in Bamako and Dakar, within 2h after blood collection. MPs were extracted from platelet-poor plasma by centrifugations at 21000 g x 2, room temperature, without deceleration. The pellet was washed twice in wash buffer (WB) previously filtered first on 0.22 µm (Millex filter, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) then on Minisart High-Flow 0.10 µm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany); (WB: 10 mM HEPES pH 7.4, 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂) containing either 5 mM EDTA (first wash (A)) or no EDTA (second wash (B))(12). The pellet was finally suspended in the WB (B) and stored at -80°C until analysis in Paris.

–Flow cytometry:

All extracted MPs were simultaneously incubated with fluorochrome-conjugated probes of (APC)-annexin-V (BD Biosciences San Jose, CA, USA) and with a specific monoclonal antibody Table SI. MPs were analysed using a BD FACS canto II cytometer BD (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and the DIVA acquisition software(13). Mouse IgG2a, IgG2b or IgG1 were used as isotopic control. MP-Count Beads (Biocytex, Marseille, France) were used to obtain absolute MPs quantification and MPs concentrations were calculated from plasmatic MP concentrations corrected by the haematocrit values.

Statistical Analysis

Data were statistically described in terms of mean ± standard deviation (SD), median and inter quartile range (IQR), or frequencies (number of cases) and percentages when appropriate. To identify potential associations between cell-derived MPs, haematological parameters, and vascular complications, we performed a multivariate linear regression

analysis with adjustment for age, sex and country, using Statistical Analysis System (SAS version 9.4). The significance level was defined as $p < 0.05$.

RESULTS

1. Clinical features of SS patients at steady state in the total cohort

Table I indicates the distribution of the selected chronic complications. We included 232 SS patients from Bamako (n = 106) and Dakar (n = 126) centres. The median age was 28.8 years with a sex ratio of 1.02. Chronic complications were dominated by microalbuminuria (56.4%), followed by retinopathy (43.7%), priapism (40.6%), pulmonary hypertension measured by a tricuspid regurgitation jet velocity > 2.5 m/s (27.2%), osteonecrosis (22.1%). The frequency of the various chronic vascular complications was obtained from the total of documented cases for the considered complication.

No significant difference was observed for the haemoglobin level nor for leukocytes and platelets counts between the two centres Table S II.

2. Haematological features in the total cohort of SS patients and AA controls

The median Hb level of 8.25 g/dL [7.50;9.40] was that usually found in the SCD population in this region(14), with a median of reticulocytes 270 G/dL [200;365]. Thirty-six healthy subjects were recruited in Bamako, with a similar mean age compared to SS patients (p = 0.95). As expected, Hb level was significantly lower in patients than in controls (p < 0.001). Platelets and leukocytes count, lactate dehydrogenase and bilirubin were higher in SS patients compared to AA controls (p < 0.001) Table II.

3. Preparation of microparticles

We followed the current recommendations for MPs purification(11). In addition, the detection of MPs requires a fine tuning between capturing MPs signals and excluding background noise. We used a BD FACS canto II cytometer and fluorescence beads (Megamix Plus SSC) as a standardization tool to define the acquisition gate of MPs and choose SSC parameter as trigger parameter, as previously shown(13). As shown in Fig. 1A, signal was acquired on a Log SSC-H/Log FSC-H dot-plot. For MPs analyses, we have

retained the area restricted to events above the 0.16 μm beads to exclude major background noise. Fig. 1B shows a typical example of the selected gates defining MPs positive for Annexin V (Q1-2), for CD235a, specific for RBCs (Q4-2) and for both (Q2-2).

4. Microparticle analyses in SS patients and AA controls

We measured MPs concentrations and compared their distribution between AA controls and SS patients. The results indicate a significantly higher concentration of leukocyte- 2958[1416;8548] vs 748[232;1636] ($p < 0.001$), erythrocyte- 6678[2986;18530] vs 1533[990;2123] ($p < 0.001$), reticulocyte- 481[97.4;2342] vs 100[77.5;161] ($p < 0.001$) and endothelial- 1560[586;5260] vs 320[163;532] cell-derived MPs ($p < 0.001$) in SS patients compared to AA controls. In contrast, the platelet-cell derived MPs were present in the same range of concentrations in both populations, 3320 [1061;8175] vs 2627 [1689;6293] MPs/mL of blood respectively ($p = 0.723$).

Next, we compared the distribution of the different cell-derived MPs and showed that the MPs in AA controls were mostly derived from platelets (50%). In contrast, in SS patients, MPs were mainly of erythroid origin (48%) Fig. 2.

5. Microparticles concentration, markers of haemolysis and vascular complications in SS patients

First, we investigated in the cohort of SS patients from Bamako and Dakar, the correlation between the MPs concentration and the usual blood markers of chronic haemolysis. Our results showed that erythrocyte and reticulocytes-derived MPs were not associated with haemolysis markers such as LDH and unconjugated bilirubin (data not shown). Erythrocyte- and reticulocyte-derived MPs levels were significantly lower in patients with retinopathy (OR=0.67, $p = 0.022$ and OR=0.67, $p = 0.005$, respectively). Reticulocyte-derived MPs were significantly negatively associated with a history of priapism (OR=0.77, $p = 0.020$) and positively associated with leg ulcers (OR=1.23, $p = 0.041$). No correlation was found

between MPs originating from other cellular origin and clinical chronic complications, except for a negative association between endothelial-derived MPs and priapism (OR=0.76, $p = 0.042$) Table III. No significant correlation was observed between leukocyte- and platelet-derived MPs and the investigated vascular complications Table S III.

DISCUSSION

Herein, we conducted for the first time a case-control study analysing circulating MPs in SS patients living in sub-Saharan Africa. We investigated at a steady state the relationship between cell-derived MPs and the history of SCD-related vascular complications such as an elevated tricuspid regurgitant jet velocity (cardiac ultrasound marker of pulmonary arterial hypertension), microalbuminuria, osteonecrosis, priapism, retinopathy and leg ulcer.

A number of groups have previously studied circulating MPs in SCD patients using a large panel of procedures leading in some cases to conflicting results(7)(15)(16). Indeed, it is now well recognized that both pre- and post-analytical procedures have a significant impact on the quantification of these extracellular vesicles. In 2013, the International Society on Thrombosis and Haematology has published recommendations for pre-analytical procedures for standardization purpose(11). The present study is the first one using this protocol in the pathophysiological context of SCD and pave the way for comparative studies.

First, we showed that 70% of all circulating MPs were derived from erythrocytes and platelets in sub-Saharan African patients with SCD. As expected, the mean concentration of endothelial, erythroid and leucocytes MPs was lower in AA controls than in SS patients at steady state. In contrast, we observed that platelets-derived MPs concentration was not significantly different in AA controls as compared to SS patients. Furthermore, the distribution between the different cell types of MPs was different. These data are in agreement with previous studies on adult patients with SCA indicating a high number of both erythrocyte-derived and platelet-derived MPs(17).

The contributions of MPs to the pathogenic mechanisms and clinical phenotypes of SCD are largely unknown(18) although a recent study from our group has shown that MPs derived from RBC and produced *in vivo*, i.e. isolated from patient's blood, may activate endothelial cells and induce a pro-adherent phenotype(15). In addition, MPs of erythroid origin have been described as biological markers associated with haemolysis in SCD(19). Indeed, several studies have reported association between erythrocyte-derived MPs and usual markers of intravascular haemolysis(20)(21)(22)(23). In our present study, neither erythrocyte- nor reticulocyte-derived MPs significantly correlated with these haemolysis markers (LDH, unconjugated bilirubin or reticulocyte counts) nor with Hb levels. It is noteworthy that the reference protocol that we used for MP isolation, although recommended, results in a loss of ~67% of erythrocyte -MPs, in particular for the larger ones(15). This could explain partly the absence of correlation between the concentration of MPs and the markers of haemolysis in this cohort. Alternatively, in the sub-Saharan African context, several factors may account for this absence of correlation since nutritional deficiencies and/or inflammatory processes due to frequent bacterial and parasitic infections (especially *Plasmodium falciparum*) highly contribute to anaemia in addition to SCD-induced haemolysis. One assumption may be that erythroid MPs are not only derived from haemolysis but could also be related to inflammation processes. Indeed, this poorly understood process appears to involve two steps: 1) initial cytoskeletal re-organization(24) and 2) externalization of phosphatidylserine, a negatively charged amino phospholipid found almost exclusively on the plasma membrane inner leaflet in cells(25). It has been established that repeated RBCs sickling-unsickling induce the shedding of MPs due to uncoupling between the membrane skeleton and the lipid bilayer, resulting from RBC membrane protein oxidation(26). Other relevant triggers of erythrocyte-derived MPs formation were reported including thrombospondin-1 present in excess in plasma from SCD patients, ATP depletion,

increased cytosolic calcium or the oxidation of sickle red cell membrane protein thiols and enhanced acid sphingomyelinase activity(27). All these publications indicate that multiple mechanisms may lead to erythroid MPs release.

Regarding the correlations of MPs with clinical complications, we observed that erythrocyte- and reticulocyte-derived MPs were significantly lower in patients with retinopathy. To our best knowledge, relationship between this complication and MPs concentration has not been addressed previously. This finding is consistent with the lower risk for retinopathy in patients with SS genotype as compared to individuals with SC genotype with less haemolysis and anaemia and higher blood viscosity(28). It is unknown whether this would translate to a role for rheology in SCD retinopathy or a direct protective role of erythrocyte- and reticulocyte-derived MPs in the retina vasculature.–This observation needs to be confirmed and the mechanistic basis of this observation remains to be elucidated.

We also evidenced a negative association between erythrocyte-derived MPs and priapism. Interestingly, relationship between priapism and haemolysis is a matter of debate: some authors have reported an association between the occurrence of priapism and a higher level of haemolysis, presumably via the consumption of nitric oxide (endothelium-derived relaxation factor)(29) while others have conversely reported that SCD patients with priapism had a lower rate of haemolysis, resulting in a higher haematocrit and greater blood viscosity, which increased the risk of corpora cavernosa sickling and blockade(30). Since it has been shown that erythrocyte-derived MPs are able to scavenge nitric oxide efficiently(31), our data do not support a major role of endothelium dysfunction resulting from reduced NO bioavailability in the pathogenesis of this sickle complication. In addition, a negative association between endothelial-derived MPs, a hallmark of endothelial alteration, and priapism was also detected.

We also observed a positive correlation between reticulocyte-derived MPs and prevalence of leg ulcer, a particularly debilitating and poorly understood complication. Some authors have suggested that SCD patients with leg ulcers may be a relatively distinct sub-phenotype, characterized by less frequent hospitalizations for vaso-occlusive pain crisis, while being prone to develop pulmonary hypertension, which suggests that these two complications share a common pathophysiology(32)(33). We did not observe such association in the BIOCADRE cohort of SCD patients, reinforcing the hypothesis that the history of SCD may be different in sub-Saharan Africa as compared to the one in industrialized countries.

Our results also contrast with some previous findings. Indeed, Olatunya et al found that erythrocyte MPs and LDH were significantly higher in SS/S β^0 patients who had elevated TRJV, suggesting that this marker of pulmonary arterial hypertension may be related to erythrocyte MPs(23) whereas we did not find any association between erythrocyte MPs and high TRJV. In contrast to our results, two studies have also reported increased concentrations of different subsets of circulating endothelial MPs in pulmonary arterial hypertension patients compared to control subjects(22)(34). These discrepancies could be related to differences in both pre- and analytical procedures used and illustrated the need to define consensus procedures for MP analysis.

Our study has some limitation since subclinical phenotypes such as asymptomatic osteonecrosis, may have been underdiagnosed. The prevalence of pulmonary arterial hypertension is also certainly overestimated because the echocardiographic measurement of TRJV is not a specific screening method for this complication. Indeed, only 25% of patients with a TRJV > 2.5 m/s exhibit pulmonary arterial hypertension by right heart catheterization(35).

Nevertheless, our study describes for the first time the associations between MPs from diverse cell types and SCD related vascular complications in the African context. Since erythroid MPs were found negatively associated with priapism and positively associated with leg ulcers, two sickle complications being supposed to be associated with the hyperhaemolytic sub-phenotype, we hypothesized that, in the African context, the hyperhaemolysis paradigm is not relevant and/or that the generation of erythroid MPs is not only due to haemolysis. Other pathophysiological pathways involving inflammatory processes could also modulate the emission of erythroid MP concentrations. To our best knowledge, this report is the first describing MPs profile in sub-Saharan Africa illustrating the feasibility of high-technology experiments in an African context and the assessment of such cellular markers as potential predictive markers for clinical complications in Africa. Further studies using larger cohorts or cohorts from other African countries are needed to confirm these findings.

ACKNOWLEDGMENTS

This work (clinical trials.gov identifier NCT03114137) was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), the Agence National pour la Recherche (ANR) and the Laboratory of Excellence GR-Ex, reference ANR-11-LABX-0051. The labex GR-Ex is funded by the program “Investissements d’avenir” of the French National Research Agency, reference ANR-11-IDEX-0005-02.

Abdoul Karim Dembélé was supported by a doctoral fellowship from the Fondation Pierre Fabre.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.K.D. and C.L. performed flow cytometry experiment, analysed data, and wrote the paper; M.D. and O.T. performed data collection and processed samples; L.O. performed the

statistical analyses; D.A.D. and S.D. performed study monitoring; J.E. analysed data, and reviewed the paper; Y.C. performed training in Senegal centre; X.J. and P.L.T contributed to the design of the BIOCADRE study and reviewed the paper; M.R. designed the research, performed the genetic analyses and wrote the paper ; B.R. designed the research, performed data analysis and co-wrote the paper ; C.L.V. designed the research and wrote the paper

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to declare

REFERENCES

1. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle cell disease. *New Eng J Med.* 2017; **376**: 1561–73.
2. Ingram VM. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature.* 1956;**178**:792–4.
3. Allali S, Maciel TT, Hermine O, De Montalembert M. Innate immune cells, major protagonists of sickle cell disease pathophysiology. *Haematologica.* 2020; **105**: 273–83.
4. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev.* 2007;**21**:37–47.
5. Noubouossie D, Key NS, Ataga KI. Coagulation abnormalities of sickle cell disease: Relationship with clinical outcomes and the effect of disease modifying therapies. *Blood Rev.* 2016;30:245-56.
6. Conran N, Belcher JD. Inflammation in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 2018;**68**(2–3):263–99.
7. Romana M, Connes P, Key NS. Microparticles in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018;**68**:319–29.
8. Hierso R, Lemonne N, Villaescusa R, Lalanne-Mistrih M-L, Charlot K, Etienne-Julan M, et al. Exacerbation of oxidative stress during sickle vaso-occlusive crisis is associated with decreased anti-band 3 autoantibodies rate and increased red blood cell-derived microparticle level: a prospective study. *Br J Haematol.* 2017;**176**:805–13.

9. Ranque B, Menet A, Diop IB, Thiam MM, Diallo D, Diop S, et al. Early renal damage in patients with sickle cell disease in sub-Saharan Africa: A multinational, prospective, cross-sectional study. *Lancet Haematol.* 2014;**1**(2):e64–73.
10. Ranque B, Menet A, Boutouyrie P, Diop IB, Kingue S, Diarra M, et al. Arterial stiffness impairment in sickle cell disease associated with chronic vascular complications. *Circulation.* 2016.;**134**:923–33.
11. Lacroix R, Judicone C, Mooberry M, Boucekine M, Key NS, Dignat-George F, et al. Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: Results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost.* 2013; **11**:1190–3.
12. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Böing AN, Romijn FP, Westendorp RG, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood.* 2000; **95**:930–5.
13. Poncelet P, Robert S, Bailly N, Garnache-Ottou F, Bouriche T, Devalet B, et al. Tips and tricks for flow cytometry-based analysis and counting of microparticles. *Transfus Apher Sci.* 2015;**53**: 110–26.
14. Dubert M, Elion J, Tolo A, Diallo DA, Diop S, Diagne I, et al. Degree of anemia, indirect markers of hemolysis, and vascular complications of sickle cell disease in Africa. *Blood.* 2017; **130**:2215–23.
15. Garnier Y, Ferdinand S, Garnier M, Cita K-C, Hierso R, Claes A, et al. Plasma microparticles of sickle patients during crisis or taking hydroxyurea modify endothelium inflammatory properties. *Blood.* 2020;**136**:247-256
16. Hebbel RP, Key NS. Microparticles in sickle cell anaemia: promise and pitfalls. *Br J Haematol.* 2016; **174**:16–29.

17. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, et al. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*. 2003;**102**:2678–83.
18. Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest*. 2017;**127**:750–60.
19. Nébor D, Romana M, Santiago R, Vachiere N, Picot J, Broquere C, et al. Fetal hemoglobin and hydroxycarbamide modulate both plasma concentration and cellular origin of circulating microparticles in sickle cell anemia children. *Haematologica*. 2013; **98**:862–7.
20. Olatunja OS, Lanaro C, Longhini AL, Penteadó CFF, Fertrin KY, Adekile A, et al. Red blood cells microparticles are associated with hemolysis markers and may contribute to clinical events among sickle cell disease patients. *Ann Hematol*. 2019;**98**:2507–21.
21. Garnier Y, Ferdinand S, Etienne-Julan M, Elana G, Petras M, Doumido L, et al. Differences of microparticle patterns between sickle cell anemia and hemoglobin SC patients. *PLoS One*. 2017;**12**:e0177397.
22. Tantawy AAG, Adly AAM, Ismail EAR, Habeeb NM, Farouk A. Circulating platelet and erythrocyte microparticles in young children and adolescents with sickle cell disease: Relation to cardiovascular complications. *Platelets*. 2013;**24**:605–14.
23. Nouraie M, Lee JS, Zhang Y, Kanas T, Zhao X, Xiong Z, et al. The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. *Haematologica*. 2013;**98**:464–72.

24. Cauwenberghs S, Feijge MAH, Harper AGS, Sage SO, Curvers J, Heemskerk JWM. Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* 2006;**580**:5313–20.
25. Kostova EB, Beuger BM, Klei TRL, Halonen P, Liefink C, Beijersbergen R, et al. Identification of signalling cascades involved in red blood cell shrinkage and vesiculation. *Biosci Rep.* 2015;**35**:e00187
26. Rank BH, Moyer NL, Hebbel RP. Vesiculation of sickle erythrocytes during thermal stress. *Blood.* 1988;**72**:1060–3.
27. Awojodu AO, Keegan PM, Lane AR, Zhang Y, Lynch KR, Platt MO, et al. Acid sphingomyelinase is activated in sickle cell erythrocytes and contributes to inflammatory microparticle generation in SCD. *Blood.* 2014;**124**:1941–50.
28. Abdalla Elsayed MEA, Mura M, Al Dhibi H, Schellini S, Malik R, Kozak I, et al. Sickle cell retinopathy. A focused review [Internet]. Vol. 257, Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2019;**257**:1353-1364.
29. Nolan VG, Wyszynski DF, Farrer LA, Steinberg MH. Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. *Blood.* 2005;**106**:3264–7.
30. Serjeant GR, Serjeant BE, Milner PF. The irreversibly sickled cell; a determinant of haemolysis in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 1969;**17**:527–33.
31. Liu C, Zhao W, Christ GJ, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB. Nitric oxide scavenging by red cell microparticles. *Free Radic Biol Med.* 2013;**65**:1164–73.
32. Halabi-Tawil M, Lionnet F, Girot R, Bachmeyer C, Lévy PP, Aractingi S. Sickle cell leg ulcers: A frequently disabling complication and a marker of severity. *Br J Dermatol.* 2008;**158**:339–44.

33. Mehari A, Alam S, Tian X, Cuttica MJ, Barnett CF, Miles G, et al. Hemodynamic predictors of mortality in adults with sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;**187**:840–7.
34. Bakouboula B, Morel O, Faure A, Zobairi F, Jesel L, Trinh A, et al. Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;**177**:536–43.
35. Parent F, Bachir D, Inamo J, Lionnet F, Driss F, Loko G, et al. A Hemodynamic Study of Pulmonary Hypertension in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2011;**365**:44–53.

Legends to figures and tables

Fig 1. Cell-derived MP analyses by flow cytometry. A: Acquisition gate was restricted to events excluding 0.16 μm calibration beads; B: Typical results from MPs positive for Annexin V (Q1-2), CD235a positive labelling specific for red cells (Q4-2) and both (Q2-2)

Fig 2. Blood-cell-type origin of MP in AA controls (A) and SS patients (B)

Table I Clinical features of the studied cohort of SS patients. Percentage are calculated from the total of documented cases.

Table II Haematological characteristics and haemolysis markers in the cohort of SS patients compare to AA controls.

Table III Correlation between vascular complications and cell-derived MPs.

Supporting information

Table S1: Specific antibodies used to determine the cellular origin of the MP

Table S2: Comparison of the clinical and haematological features of the SS patients in Bamako and Dakar.

Table S3: Correlation between vascular complications and MPs concentration

Origin	Antibodies	Clones	Fluorochromes	Providers
Platelet	CD41	HIP8	PE	BioLegend (San Diego. CA. USA)
Leucocyte	CD45	HI30	FITC	BioLegend (San Diego. CA. USA)
Erythrocyte	CD235a	GA-R2 (HIR2)	PE-Cy7	BioLegend (San Diego. CA. USA)
Reticulocyte	CD71	M-A712	PE	BD Biosciences (San Jose. CA. USA)
Endothelial cell	CD106	PNA 66085	PE	Beckman Coulter (Brea. CA. USA)

Table SI

Clinical variables	SS patients	N
Age (mean, SD)	28.8 (11.0)	232
Female sex	116 (49.4%)	232
Microalbuminuria	84 (56.4%)	149
Retinopathy	31 (43.7%)	71
History of priapism	43 (40.6%)	106
Tricuspid regurgitation jet velocity >2,5 m/s	58 (27.2%)	213
Osteonecrosis	46 (22.1%)	208
No vascular complication	36 (16.8%)	214
Leg ulcers	33 (15.6%)	211

Table I

Clinical variables	Bamako (n=106)	Senegal (n=126)
Age (mean. SD)	28.8 (10.6)	28.0 (11.3)
Female sex	63 (59.4%)	53 (42%)
Osteonecrosis	26 (24.8%)	20 (19.4%)
Retinopathy	31 (43.7%)	NA
TRJV > 2.5 m/s	12 (13.5%)	46 (37.1%)
Microalbuminuria	70 (71.4%)	14 (27.5%)
Priapism	21 (50%)	22 (34.4%)
Leg ulcers	22 (21.6%)	11 (10.1%)
No vascular complication	6 (5.6%)	30 (23.8%)
Biological variables		
Hemoglobin. g/dL. median (IQR)	8.55 [7.80;9.78]	8.09 [7.30;8.89]
Leukocytes. G/L. median (IQR)	10.7 [8.68;12.6]	12.3 [9.20;15.8]
Platelets. G/L. median (IQR)	494 [383;582]	453 [339;512]
Lactate dehydrogenase (IU/L)	1097 [776;1438]	659 [504;861]

Table SII

	SS patients (n=232)	AA controls (n=36)	
Socio demographics variables			p value
Age (mean. SD)	26.5 [20.8;35.0]	29.0 [22.0;34.0]	0.95
Female sex	116 (49.4%)	16 (46%)	
Biological variables			
Leukocytes. G/L. median [IQR]	11.2 [8.96;13.8]	5.19 [4.28;5.72]	<0.001
Hemoglobin. g/dL. median [IQR]	8.25 [7.50;9.40]	13.4 [12.8;146]	<0.001
Reticulocyte G/L. median [IQR]	270 [200;365]	ND	-
Hematocrit (%)	26.1 [23.1;29.4]	39.5 [38.5;43.4]	<0.001
Platelets. G/L. median [IQR]	462 [353;544]	301 [250;338]	<0.001
Lactate dehydrogenase (UI/L)	826[595;1149]	232 [193;351]	<0.001
Bilirubin (mmol/L)	29.1[17.9;43.6]	8.00[6.50;10.5]	<0.001

Table II

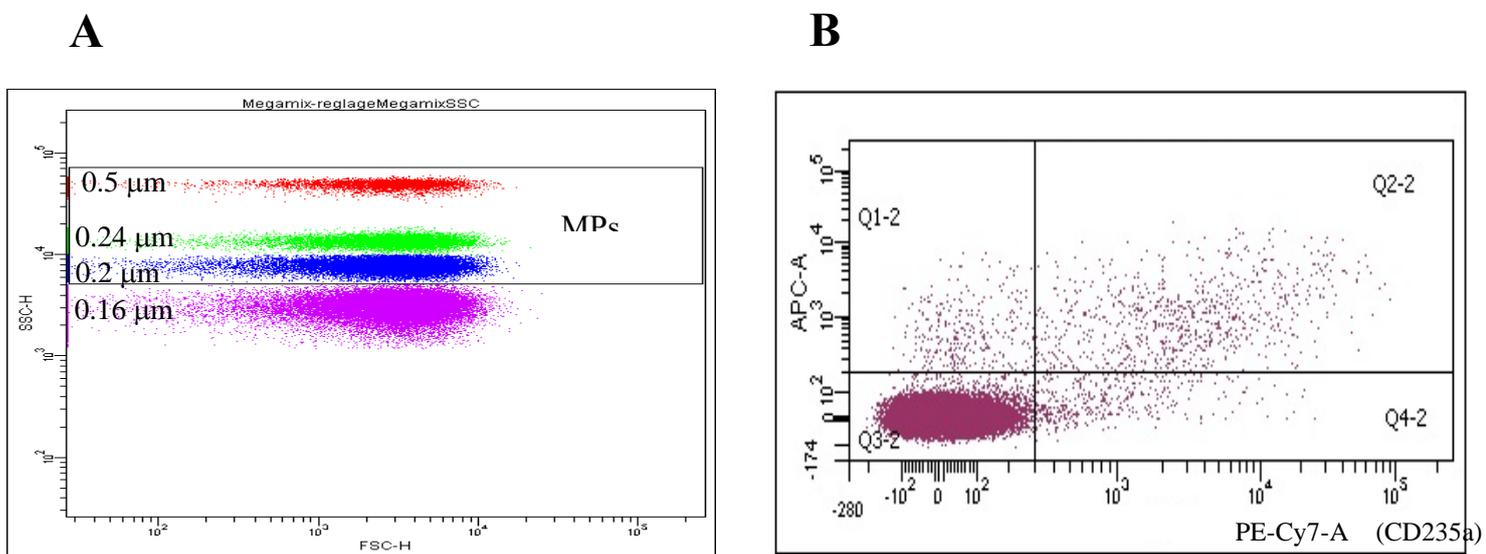
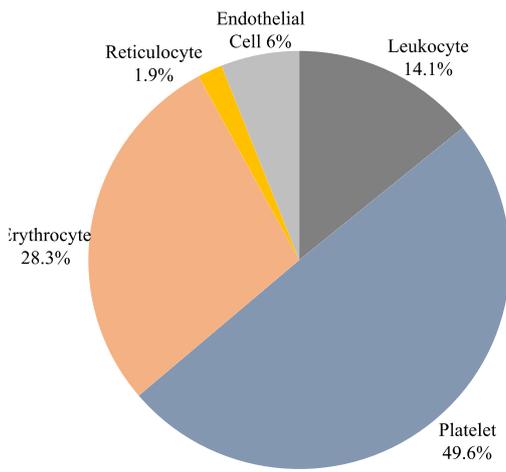


Fig. 1

A



B

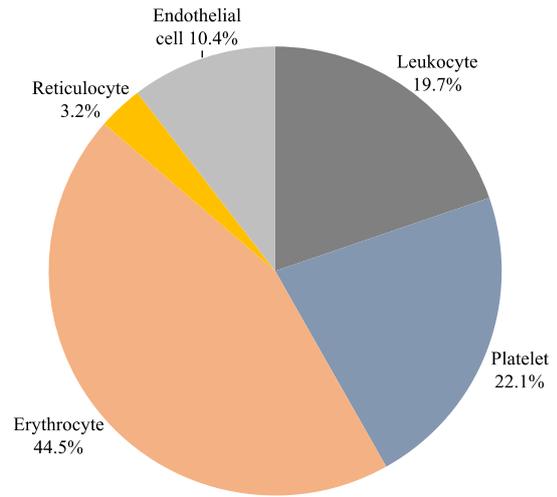


Fig. 2

Clinical complications	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	OR [CI 95%]	p value	OR [CI 95%]	p value
Erythrocyte MPs				
TRJV > 2.5 m/s	1.11 [0.88;1.39]	0.3783	1.13 [0.89;1.43]	0.3196
Microalbuminuria	0.9 [0.7;1.14]	0.3719	0.98 [0.75;1.28]	0.8653
Osteonecrosis	0.85 [0.67;1.08]	0.1921	0.88 [0.68;1.13]	0.3265
Priapism	0.87 [0.65;1.14]	0.3012	0.86 [0.65;1.14]	0.3055
Retinopathy	0.48 [0.28;0.75]	0.0027	0.48 [0.28;0.75]	0.0028
Leg ulcer	1.23 [0.94;1.63]	0.1414	1.26 [0.95;1.69]	0.114
No vascular complication	0.94 [0.72;1.21]	0.6159	0.89 [0.66;1.18]	0.404
Reticulocyte MPs				
TRJV > 2.5 m/s	1.06 [0.91;1.23]	0.4842	1.08 [0.92;1.28]	0.3513
Microalbuminuria	0.92 [0.78;1.07]	0.2817	0.96 [0.81;1.14]	0.6398
Osteonecrosis	1.01 [0.86;1.19]	0.8778	1.04 [0.89;1.24]	0.6092
Priapism	0.76 [0.61;0.93]	0.0099	0.77 [0.62;0.95]	0.0200
Retinopathy	0.68 [0.51;0.88]	0.0059	0.67 [0.5;0.87]	0.0052
Leg ulcer	1.2 [0.99;1.48]	0.0683	1.23 [1.02;1.52]	0.0408
No vascular complication	1.01 [0.85;1.2]	0.9043	0.93 [0.77;1.14]	0.4887
Endothelial cells MPs				
TRJV > 2.5 m/s	1.14 [0.94;1.4]	0.1956	1.19 [0.98;1.47]	0.0958
Microalbuminuria	1.01 [0.79;1.29]	0.9484	1.04 [0.79;1.38]	0.7532
Osteonecrosis	0.89 [0.73;1.09]	0.2543	0.87 [0.71;1.08]	0.2108
Priapism	0.79 [0.6;1.01]	0.0684	0.76 [0.58;0.98]	0.0419
Retinopathy	0.76 [0.52;1.1]	0.1537	0.76 [0.51;1.1]	0.1533
Leg ulcer	1.19 [0.92;1.56]	0.2100	1.16 [0.89;1.55]	0.2810
No vascular complication	0.89 [0.71;1.11]	0.2919	0.94 [0.75;1.19]	0.5918
No vascular complication	1.16 [0.91;1.51]	0.2448	1.10 [0.84;1.46]	0.4860

Table III

Clinical complications	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	OR [CI 95%]	p value	OR [CI 95%]	p value
Leukocyte MPs				
TRJV > 2.5 m/s	1.13 [0.89;1.44]	0.3211	1.09 [0.84;1.42]	0.5273
Microalbuminuria	0.88 [0.69;1.11]	0.2903	0.99 [0.75;1.29]	0.9221
Osteonecrosis	0.88 [0.69;1.13]	0.3166	0.92 [0.71;1.18]	0.4953
Priapism	0.87 [0.63;1.2]	0.4051	0.87 [0.63;1.2]	0.4136
Retinopathy	0.93 [0.67;1.29]	0.6585	0.92 [0.66;1.28]	0.6138
Leg ulcer	1.05 [0.79;1.4]	0.7258	1.06 [0.8;1.41]	0.6781
No vascular complication	1.06 [0.81;1.4]	0.6669	1.01 [0.73;1.38]	0.9936
Platelet MPs				
TRJV > 2.5 m/s	1.11 [0.91;1.37]	0.3185	1.17 [0.94;1.47]	0.1773
Microalbuminuria	0.76 [0.59;0.97]	0.0335	0.86 [0.65;1.12]	0.2605
Osteonecrosis	0.83 [0.67;1.04]	0.1084	0.88 [0.69;1.11]	0.2672
Priapism	0.81 [0.6;1.08]	0.1527	0.81 [0.6;1.09]	0.1726
Retinopathy	0.85 [0.6;1.18]	0.3252	0.84 [0.59;1.17]	0.3076
Leg ulcer	0.87 [0.67;1.12]	0.2800	0.88 [0.68;1.15]	0.3568
No vascular complication	1.16 [0.91;1.51]	0.2448	1.10 [0.84;1.46]	0.4860

Table SIII

2. Transfusion et prise en charge de la vasculopathie cérébrale : effet sur l'activation et le vieillissement des polynucléaires neutrophiles

Nous avons vu le rôle récemment mis en évidence des PNN dans la pathogénie de la drépanocytose.

Dans ce second chapitre, nous avons analysé l'impact des échanges transfusionnels associés, ou pas, à un traitement par l'hydroxycarbamide sur le profil inflammatoire des PNN chez des patients drépanocytaires issus d'une cohorte pédiatrique de l'hôpital Robert Debré à Paris.

Le but était de :1) caractériser le phénotype des PNN chez les patients sous échange et de tester l'hypothèse que la persistance de PNN «agés» et pro-inflammatoires pourrait contribuer à la persistance de la vasculopathie cérébrale malgré le régime transfusionnel et 2) étudier l'impact du traitement par HC associé aux programmes de transfusion sur l'activation des neutrophiles

2.1 Article 3 : Inflammatory neutrophil phenotype in children with sickle cell disease despite chronic exchange transfusion program: a cause of persistent cerebral vasculopathy ?

Résumé : Phénotype inflammatoire des polynucléaires neutrophiles chez les enfants drépanocytaires sous programme d'échanges transfusionnels chroniques : une cause de vasculopathie cérébrale persistante?

Contexte : Bien que le globule rouge soit la cellule affectée par la mutation génétique responsable de la drépanocytose, d'autres éléments figurés du sang sont impliqués, notamment les polynucléaires neutrophiles (PNN) rendant beaucoup plus complexe la physiopathologie qu'on ne le pensait à l'origine. La vasculopathie cérébrale est une complication de la drépanocytose, prédisposant à la survenue d'accidents vasculaires cérébraux. En 1998, l'essai de prévention des accidents vasculaires cérébraux a démontré que les transfusions sanguines mensuelles pouvaient réduire le risque d'accident vasculaire cérébral de 90% chez les enfants drépanocytaires atteints de vasculopathie cérébrale. Cependant, en termes d'évolution, il existe une grande hétérogénéité de la vasculopathie cérébrale chez les patients recevant des transfusions chroniques. Le but de notre étude était d'étudier l'impact des échanges transfusionnels chroniques sur le phénotype d'activation ou d'âge des PNN chez les enfants drépanocytaires.

Patients et méthodes : Nous avons réalisé une étude prospective incluant 53 patients SS avec vasculopathie cérébrale et 10 donneurs sains. Parmi les patients, 20 étaient inclus dans un programme d'échange transfusionnel chronique avec durée moyenne de 4,9 ans, en raison d'une vasculopathie cérébrale persistante, 12 patients sans traitements spécifiques, 11 traités par HC, 11 traités à la fois par échange transfusionnel et hydroxycarbamide (HC). Les échanges transfusionnels mensuels étaient réalisés soit par érythraphérèse, soit par échanges manuels. Les PNN ont été purifiés à partir d'échantillons de sang frais prélevé avant la séance d'échange transfusionnel. Nous avons quantifié par cytométrie en flux l'expression de 3 intégrines (CD18, CD11a, CD11b), 3 marqueurs d'âge (CD182, CD184, CD62L) et 2 molécules d'adhérence (CD162 et CD66a). Nous avons également mesuré par ELISA le taux plasmatique d'élastase, qui reflète l'activité NETose des PNN.

Résultats : Comparés aux sujets sains, les patients drépanocytaires présentaient une hyperleucocytose avec phénotype activé des PNN, caractérisé par une surexpression des intégrines, des marqueurs d'âge et des molécules d'adhérence et une augmentation de l'élastase plasmatique. Qu'il s'agisse des patients sous érythraphérèse ou échange manuel, nous n'avons pas observé une différence dans l'expression des intégrines, des sélectines, des marqueurs d'âge et de l'élastase plasmatique. Comparés aux patients SS non traités, les PNN des patients recevant de l'HC montrent une baisse de la leucocytose et de l'expression des intégrines membranaires. L'ajout de la thérapie HC chez 11 patients dans le programme de transfusion d'échange a permis d'atténuer la leucocytose et l'expression de l'intégrine membranaire.

Conclusion : Notre étude montre pour la première fois que les échanges transfusionnels manuels ou par érythraphérèse ne permettent pas de corriger le phénotype inflammatoire pathologique des PNN au cours de la drépanocytose. Compte tenu du rôle majeur de l'inflammation dans les lésions endothéliales de la drépanocytose, nos données pourraient à

expliquer l'efficacité partielle des programmes d'échange transfusionnel dans la vasculopathie cérébrale.

Inflammatory neutrophil phenotype in children with sickle cell disease under chronic exchange transfusion program: a cause of persistent cerebral vasculopathy?

Article en préparation

Abdoul Karim DEMBELE^{1,2,3}, Patricia HERMAND^{1,2,4}, Florence MISSUD^{1,5}, Emmanuelle LESPRIT^{1,5,6}, Malika BENKERROU^{1,5}, Caroline LE VAN KIM^{1,2,3}, Bérengère KOEHL^{1,2,3,5}
¹University of Paris, UMR_S1134, BIGR, Inserm, F-75015 Paris, France; ²Institut National de Transfusion Sanguine, F-75015 Paris, France; ³Centre de Recherche et de Lutte contre la Drépanocytose (CRLD), Bamako, Mali; ⁴Laboratoire d'Excellence GR-Ex; ⁵Sickle Cell Disease Center, Hematology unit, Robert Debré Hospital, AP-HP, Paris, France; ⁶Etablissement Français du Sang, Paris, France

Abstract

Sickle cell disease (SCD) is a severe hemoglobinopathy due to the production of abnormal hemoglobin S (HbS). Although red blood cell (RBC) dysfunction is the major contributor to the disease, many studies highlighted the crucial role of platelets and polymorphonuclear neutrophils (PMNs), both during acute and chronic complications. Ischemic stroke represents one of the most severe complication in SCD and is due to large cerebral artery occlusion. In 1998, the Stroke Prevention (STOP) trial demonstrated that monthly blood transfusions could reduce the risk of stroke by 90% in SCD children with cerebral vasculopathy (CV). However, there is a wide heterogeneity in the course of CV in patients receiving chronic transfusions.

The aim of our study is to investigate the impact of transfusion programs on neutrophils activation and ageing, in order to identify if inflammation could contribute to the persistence of CV despite red cell transfusion.

We performed a prospective study including 54 children with SS genotype: 12 with no specific treatment, 11 treated by hydroxycarbamide (HC), 20 on exchange transfusion program, and 11 both on exchange transfusion program and HC treatment due to persistent CV. Exchange transfusion are carried out monthly either by erythrapheresis or by manual exchanges. Neutrophils were labelled with markers of activation (CD18, CD11a, CD11b, CD182), adhesion (CD162 and CD66a), and ageing (CD184, CD62L). We also measured the plasmatic level of elastase, which reflects the NETose activity of PMNs.

High leukocytosis and activated profile of PMNs were observed in the 12 non-transfused patients compared to healthy controls, characterized by an overexpression of the integrin CD18/CD11b ($p=0,03$) and CD18/CD11a ($p=0,02$), CD162 ($p=0,01$) and CD66a ($0,01$) a higher level of circulating aged PMNs CD184^{high}/CD62L^{low} ($p=0,04$), as well as a higher plasmatic level of elastase ($p=0.01$).

As expected, a decrease in high leukocytosis and membrane integrin expression CD18/CD11b and CD18/CD11a is observed in the PMNs from the 11 patients receiving HC compared to the untreated SS patients. The HC treatment in 11 patients in exchange transfusion program alleviates neutrophilic leukocytosis and membrane integrin expression.

Interestingly, PMNs from the 20 patients receiving monthly exchange transfusion exhibited identical expression pattern of integrins, selectins, ageing markers and elastase level compared to the PMNs profile from non-transfused patients. This activation profile was the same for patients on manual exchange or erythrapheresis.

In total, our study shows for the first time that replacing sickle RBC with healthy RBC is not sufficient to reverse the pathological phenotype of PMNs in SCD. Given the major role of inflammation in endothelial damage and vasculopathy in SCD, our data give explanation to the incomplete efficacy of transfusion exchange programs to treat CV and open the key question of combining therapeutics based on anti-inflammatory and/or anti-white blood cell adhesion drugs for these patients.

Introduction

Sickle cell disease (SCD) is the most common form of monogenic disease, due to a single mutation in the β -globin gene, resulting in the production of abnormal hemoglobin S (HbS) in the red blood cell (RBC). SCD currently represents a global health issue, both in Africa, Europe and the United States (Piel et al., 2013). SCD is characterized by chronic hemolytic anemia and acute vaso-occlusive events due to RBCs sickling in the capillaries of the microcirculation in hypoxia and progressive chronic damages in heart, kidney, brain, retina, bone and skin tissue (Kato et al., 2009).

Although RBC dysfunction is the major contributor to the disease, other cell types represent key actors in the pathophysiology of SCD (Kau et al., 2009; Turhan et al., 2002). Several studies have highlighted the important role of platelets, monocytes and polymorphonuclear neutrophils (PMNs) in activating and damaging the vascular endothelium (Ahmed et al., 2017; Zhang et al., 2016).

Neutrophils dysfunction has a major impact on the severity of the disease since high neutrophil counts and activation correlate with early death, silent brain infarcts, hemorrhagic strokes, and acute chest syndrome in SCD patients (Kinney, Sleeper, et al., 1999; Ohene-Frempong et al., 1998). Several studies have also highlighted the pathological aspect of neutrophil extracellular trap formation (NETosis) in patients with sickle cell disease (Chen et al., 2014). Besides its effect in the induction of fetal Hb (HbF) expression (Cokic et al., 2003; Letvin et al., 1984), hydroxycarbamide (HC) has a major anti-inflammatory effect by

decreasing the number and activation of leukocytes, reducing endothelial stress, modulating the circulation of pro-inflammatory cytokines and reducing the adhesion of sickle RBCs to the endothelium (Bridges et al., 1996; Saleh et al., 1999).

Ischemic stroke represents a severe complication in SCD and is due to large cerebral artery occlusion. In 1998, the Stroke Prevention (STOP) trial indicated that monthly blood transfusions could reduce the risk of stroke by 90% in SCD children with cerebral vasculopathy (CV) (Adams et al., 1998). However, there is a wide heterogeneity in the improvement of CV in patients receiving chronic transfusions. Indeed, only 50% of transfused patients improve their CV under transfusion program, while 25% are only stabilized and 25% continue to get worse despite a percentage of HbS below 30% (Bader-Meunier et al., 2009). This failure to recover from CV condemns patients to undergo a chronic transfusion program for years, sometimes decades, with its procession of potential side effects i.e difficulty of venous access, allo-immunization and iron overload.

In this study, we investigate for the first time the impact of transfusion programs on neutrophil activation and ageing, and decipher if inflammation and neutrophil status could contribute to the persistence of CV despite a transfusion program that reach its objectives by decreasing HbS and improving deep anemia.

Methods

Patients and healthy volunteers

We conducted a prospective monocentric study with SCD patients (SS genotype) and healthy blood donors as controls. SS patients were aged 2 to 18 years old and at steady state (no concomitant infection, no acute events in the past month) at the time of sampling. The Ethical Evaluation Committee for Biomedical Research Projects (CEERB) of Robert Debré Hospital, France approved the study (reference number CPP 74/18_3). Informed consent were obtained from all participants prior to inclusion.

The study population consisted of untreated SS patients (neither by HC nor by chronic transfusion program), SS patients with HC treatment for more than 6 months, and SS patient undergoing exchange transfusion program for at least 12 months because of CV defined by high blood flow velocity on transcranial doppler and/or intracranial or cervical arterial stenosis detected by cerebral magnetic resonance angiography, and/or past history of stroke. Among the SS patients undergoing exchange transfusion, some were receiving additional HC treatment, mostly due to previous prescription that had not been discontinued at the time

of the exchange program. Exchange transfusions were carried out either by erythrapheresis, or by manual exchange transfusion, this latter consisting of the continuous bleeding of approximately 30 ml/kg of whole blood compensated by the simultaneous infusion of diluted packed RBCs as previously described (Koehl et al., 2016). The aim of this transfusion program is to maintain patients with less than 30% of HbS at all times.

Human polymorphonuclear neutrophils preparation

Human polymorphonuclear neutrophils were isolated from fresh whole blood within 4h after blood sampling with EDTA as anticoagulant, using a MACSxpress Neutrophil Isolation Kit followed by MACSxpress Erythrocyte Depletion Kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) as previously describe (Koehl et al., 2017).

Immunophenotypic characterization of human polymorphonuclear neutrophils

The neutrophils characterization was performed by flow cytometry. Isolated neutrophils were incubated with fluorescent-labeled specific anti-human cells surface monoclonal antibodies: anti-CD18-FITC/CD11a-PE/CD11b-APC for integrins; anti-CD162-PE/CD66a-APC for adhesion molecules and anti-CD182-Per-Cy7/anti-CD184-Pacific-blue/anti-CD62L-APC to identify aged-neutrophils. The sample acquisition was performed using a FACS BD Canto II (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) and the analyze was conducted using the FlowJo Software (version 6.2).

PMN plasmatic elastase quantification

The PMN Elastase plasma levels were detected using PMN Elastase Human Elisa Kit (ab119553 Abcam).

Data collection and statistical analyses

The data were collected in a standardized form: sex, age at the day of the inclusion, treatment or not with HC, characteristics of CV and chronic transfusion program (method used, program start date) if applicable and biological parameters at the day of the sampling.

Categorical variables were described as percentages and numbers. Continuous variables were described by medians and IQRs. The χ^2 or Fisher's exact test for categorical variables and Mann-Whitney-Wilcoxon test for continuous variables were used to compare the different groups. A p value of <0.05 was considered as significant (two-sided).

Results

Clinical profile of the patients

57 patients were included in the study: 12 untreated SS patients, 11 SS patients with HC treatment, 20 SS patient undergoing exchange transfusion program (including 14 receiving erythrapheresis and 6 under continuous manual exchange transfusion), 11 SS patients undergoing both erythrapheresis and HC treatment.

Out of 31 patients on exchange transfusion program for CV, 3 had been enrolled in the exchange program because of a pathological high blood flow velocity in at least one intracranial large arteries of the circle of Willis diagnosed by Transcranial Doppler (TCD) without stenosis in cerebral magnetic resonance angiography (MRA), 12 of them because of high blood flow velocity on TCD associated with one or more areas of stenosis in the intracranial arteries documented by MRA, 5 of them due to high blood flow velocity on TCD associated with one or more areas of stenosis in the cervical arteries, and 11 due to an history of inaugural stroke, related to an intracranial stenosis secondarily diagnosed by cerebral MRA. The median duration of exchange program was 3.65 years [1.23 ; 8.26]. At the time of the study, 77% of patients (n=24) had persistent brain lesions despite the exchange program, 13% (n=4) improved their brain lesions since the beginning of the exchange program, and 10% (n=3) had worsened brain lesions (worsening cerebral stenosis and/or recurrent stroke). These clinical data are summarized in Table 1.

Hematological profile of the patients

As expected, SS patients have high leukocytosis (median: 12020 $10^9/L$, IQ [8650; 13455]) with predominance of PMNs (median: 5589 $10^9/L$, IQ [4284; 6663]) and high monocytes count (median: 1221 $10^9/L$, IQ [880; 1536]). HC treatment leads to a decrease in leukocyte counts (median leukocyte counts: 8060 $10^9/L$, IQ [7215; 13455]; median PMN counts: 2493 $10^9/L$, IQ [1616; 3932] and median monocyte counts: 674 $10^9/L$, IQ [415; 904]). Patients in exchange transfusion programs exhibited persistent hyperleukocytosis, particularly those with erythrapheresis (median leukocyte counts: 12920 $10^9/L$, IQ [9960; 15570]; median PMN counts: 7316 $10^9/L$, IQ [4747; 9286], median monocyte counts: 848 $10^9/L$, IQ [625; 1240]). However, the addition of HC treatment in the exchange transfused patients results in a decrease in white blood cells (median leukocyte counts: 10210 $10^9/L$, IQ [9310; 11095]; median PMNs counts: 5334 $10^9/L$, IQ [3916; 7077], median monocyte counts: 964 $10^9/L$,

IQ [762; 1174]). SS patients also tend to have a high platelet count, which persists under the transfusion program. Detailed biological data are presented in Table 1.

Markers of neutrophil ageing

PMNs from untreated SS patients exhibit an ageing phenotype, characterized by a CD62L^{low}/CD184^{high}/CD182^{high} expression profile, compare to AA controls with $p=0,0071$; $p=0,0121$ and $p=0,0205$, for each marker, respectively (Fig. 1A). Interestingly, in the neutrophils from SS patients undergoing transfusion program all these three markers were similarly expressed compare to those from non-transfused SS patients, both by erythrapheresis and by manual exchange transfusion (Fig. 1A). This indicates that neutrophils exhibited an ageing profile despite transfusion programs.

Expression of neutrophil adhesion molecules

PMNs from non-transfused, untreated SS patients showed significantly elevated expression of the integrins LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) compare to AA controls ($p=0.031$, $p=0,0190$ respectively), indicating PMNs activation.

Neutrophils from patients in exchange transfusion programs whatever in manual exchange or under erythrapheresis exhibited persistent high expression of the same integrins compare to non-transfused patients (Fig1B).

Similarly, a higher expression of P-selectin glycoprotein ligand-1 CD162 ($p=0,0111$) and CD66a ($p=0,0105$) in PMNs from non-transfused, non-treated SS patients compared to AA healthy controls was observed (Fig 1C). Again, the expression of these adhesion molecules were not decreased in patients under exchange transfusion program, in particular for erythrapheresis, indicating a persistence of the neutrophil activation state.

Plasmatic elastase level

Since neutrophil extracellular trap formation (NETosis) plays an important role in the pathogenesis of SCD in particular in inflammation, we investigated NETosis in our cohort of patients. We quantified plasmatic levels of elastase- α 1-antitrypsin complexes as a measure of NET formation.

Non-transfused untreated SS patients showed significantly higher plasmatic level of elastase compare to AA controls ($p=0.01$). But interestingly, patients in exchange transfusion program exhibited persistent high level of elastase both in erythrapheresis and in manual processes (Fig1D).

Effect of HC treatment on PMNs activation and ageing profile

Neutrophils from SS patients treated with HC exhibit a significant decrease of leucocytes count and of the integrins LFA-1 ($p = 0.0571$) and Mac-1 ($p=0.0297$) expression compare to untreated patients (Fig 2B). Surprisingly, HC do not have significant effect on the expression of the other adhesion molecules (CD162 and CD66a), nor on ageing markers (CD184, CD182, CD62L) nor on plasmatic elastase levels in SS patients compare to AA controls (Fig 2A and C). PMNs from patients treated both with HC and erythrapheresis show the same pattern of expression on PMNs as observe in SS patients treated with HC only, with a decreased expression of LFA-1 and MAC-1, although this decrease did not reach significance (Fig 2B) and no effect on other adhesion molecules nor ageing markers.

Discussion

Herein, we investigated for the first time the impact of chronic red cell transfusion on the inflammatory phenotype of neutrophils in SCD patients. The underlying objective is to better understand the causes of transfusion program unsuccess in patients with cerebral vasculopathy. While chronic transfusions reduce the risk of stroke, either as primary or secondary prevention, recovery from brain vasculopathy is still in the minority in these patients, and no therapeutic progress has been made in this field since the STOP study (Bader-Meunier et al., 2009; Bishop et al., 2011; Brousse et al., 2009) This raises the medico-economical question of the consumption of packed red blood cells with a significant cost, and with the transfusion exchange programs for years or even decades, with major iatrogenic complications (iron overload, alloimmunization, deterioration of venous access). Then, a better understanding of the failure to reverse cerebral vasculopathy would allow for therapeutic progress. Our hypothesis is that the inflammatory phenotype in particular the activated and aged neutrophils may explain, at least in part, this failure despite the efficient improvement of anemia and the decrease of HbS level described in many studies (Davis et al., 2017; Yawn et al., 2014) .

First of all, we observed an aged and activated profile of PMNs in the 12 non-transfused SS patients compared to healthy controls, characterized by an overexpression of the integrin CD18/CD11b (Mac-1) and CD18/CD11a (LFA-1), a higher level of circulating aged PMNs CD184^{high}/CD62L^{low}, and a higher expression of CD162 (P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1) and CD66a. These data are in agreement with previous studies on SCD patients indicating that PMNs exhibit an activation phenotype (Lard et al., 1999; Zhang et al., 2015).

Then, we analyzed the impact of the exchange transfusion on the inflammatory phenotype of PMNs. In SS patients receiving monthly erythrapheresis or included in a manual exchange program, we found a persistent high leukocytosis and an identical expression pattern of integrins, adhesion molecules and ageing markers level in their neutrophils compare to those from non-transfused patients.

Our data strongly suggest that chronic blood transfusions either by erythrapheresis or manual exchange (although the number of investigated patients is low in this later process) in pediatric SS patients failed to modify the activated phenotype of PMNs. A persistence of the PMNs activation is observed both in erythrapheresis, where plasma and white blood cells go back to the patient, and in manual exchanges, where the patient is bled from a large volume of whole blood. Surprisingly, this neutrophil activation is even higher using erythrapheresis compare to manual exchanges. In our study, the blood samples were used systematically *before* the transfusion exchange. It could be interesting in a future study to investigate the phenotype of neutrophils *before and after* the sessions of erythrapheresis, to determine whether the process of sorting blood cells by the erythrapheresis apparatus (centrifugation, passing through tubing made of synthetic materials,...) could stimulate the activation of the blood cells that return to the patient.

Whatever, the persistence of neutrophil activation despite exchange transfusion program could contribute to the defect in alleviation, or to the progression of CV in SS children. As reported, inflammation promotes vascular adhesion of blood circulating cells which contributes to vascular lesions and intimal hyperplasia (Connes et al., 2013; Switzer et al., 2006). Increased leucocytes count in SCD patients has been demonstrated to represent a risk factor for silent infarct (Kinney, Helms, et al., 1999) and for cerebral vasculopathy (Sommet et al., 2016). We evidence that in addition to the persistence of high leukocyte counts, neutrophils remain activated and exhibit an aged phenotype, despite exchange transfusion program. This may contribute to the persistence or the degradation of CV damage, depending of the inflammatory status of the patient.

In the PMNs from patients treated with HC, we found a significant decrease in leucocyte and PMNs counts and in the expression of integrins, compare to the PMNs from non-transfused patients (Table 1 and Figure 2B). But HC fails to reverse the aged phenotype of neutrophils, as well as the expression of other adhesion molecules such as PSGL1 (CD162).

Finally, we observed a higher plasmatic level of elastase, which reflects the NETosis activity of PMNs in SS patients compare to healthy donors. This abnormal and excessive NETosis level fails to be recovered neither by exchanges transfusion nor HC treatment. Since NETs emission can induce coagulation and trigger vascular injury (Barbu et al., 2020; Castanheira & Kubes, 2019; Chen et al., 2014), it is plausible that this process could also contribute to the persistence of CV in SCD children.

It is noteworthy that HC is less effective in decreasing the different leukocyte activation markers in transfused patients than in non-transfused patients. We are aware that compliance to HC treatment may be lower in the transfused group than in the non-transfused group. This could be explained, at least in part, because patients in the non-transfused group are treated with HC in order to decrease the frequency and intensity of painful vaso-occlusive crisis, and this represents a major motivation. In contrast, transfused patients are characterized by few or no vaso occlusive events. In the same line, the usual criteria for monitoring HC benefit, is the increase in hemoglobin level and in Mean Corpuscular Volume (MCV), but this marker is no longer interpretable in chronic transfused patients. This can lead to difficulties in the following of compliance in treated patients.

The conclusions of our study are limited due to the small number of patients, especially when comparing patients on erythrapheresis and those on manual exchange transfusions. In addition, patients with CV were all under transfusion programs, then patients who had recovered from their CV and had left the exchange program were not included. The question therefore remains whether these cured patients had a different inflammatory phenotype from those with persistent CV. In total, a longitudinal follow-up of the patients, from the initiation of the transfusion program and during the first months, or even throughout the years of the exchange program, would make it possible to investigate more precisely the impact of the exchange transfusions on the activation of the PMNs and on the associated inflammatory phenotype, as well as a potential correlation with the status of CV. Longitudinal studies are also undoubtedly necessary before concluding on the benefit of adding HC on the clinical and radiological evolution of CV and therapeutic education would be useful in order to explain the benefit of this treatment to the patients.

In conclusion, our study shows for the first time that replacing sickle RBCs with healthy RBCs is not sufficient to treat the inflammatory profile of SCD. Given the major role of inflammation in endothelial damages in SCD, our data could explain the incomplete efficacy

of transfusion exchange programs in CV. This raises the question of systematically combining HC treatment or other anti-inflammatory and anti-white blood cell adhesion treatments such as P-Selectin inhibitors for these patients.

References

- Adams, R. J., McKie, V. C., Hsu, L., Files, B., Vichinsky, E., Pegelow, C., Abboud, M., Gallagher, D., Kutlar, A., Nichols, F. T., Bonds, D. R., Brambilla, D. (1998). Prevention of a First Stroke by Transfusions in Children with Sickle Cell Anemia and Abnormal Results on Transcranial Doppler Ultrasonography. *New England Journal of Medicine*, 339(1), 5–11.
- Ahmed, A. E., Ali, Y. Z., Al-Suliman, A. M., Albagshi, J. M., Salamah, M. Al, Elsayid, M., Alanazi, W. R., Ahmed, R. A., McClish, D. K., & Al-Jahdali, H. (2017). The prevalence of abnormal leukocyte count, and its predisposing factors, in patients with sickle cell disease in Saudi Arabia. *Journal of Blood Medicine*, 8, 185–191.
- Bader-Meunier, B., Verlhac, S., Elmaleh-Bergès, M., Ithier, G., Sellami, F., Faïd, S., Missud, F., Ducrocq, R., Alberti, C., Zaccaria, I., Baruchel, A., & Benkerrou, M. (2009). Effect of transfusion therapy on cerebral vasculopathy in children with sickle-cell anemia. *Haematologica*, 94(1), 123–126.
- Barbu, E. A., Mendelsohn, L., Samsel, L., & Thein, S. L. (2020). Pro-inflammatory cytokines associate with NETosis during sickle cell vaso-occlusive crises. *Cytokine*, 127.
- Bishop, S., Matheus, M. G., Abboud, M. R., Cane, I. D., Adams, R. J., Jackson, S. M., & Kalpathi, R. (2011). Effect of chronic transfusion therapy on progression of neurovascular pathology in pediatric patients with sickle cell anemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 47(2), 125–128.
- Bridges, K. R., Barabino, G. D., Brugnara, C., Cho, M. R., Christoph, G. W., Dover, G., Ewenstein, B. M., Golan, D. E., Guttmann, C. R. G., Hofrichter, J., Mulkern, R. V., Zhang, B., & Eaton, W. A. (1996). A multiparameter analysis of sickle erythrocytes in patients undergoing hydroxyurea therapy. *Blood*, 88(12), 4701–4710.
- Brousse, V., Hertz-Pannier, L., Consigny, Y., Bresson, J. L., Girot, R., Mirre, E., Lenoir, G., & de Montalembert, M. (2009). Does regular blood transfusion prevent progression of cerebrovascular lesions in children with sickle cell disease? *Annals of Hematology*, 88(8), 785–788.

- Castanheira, F. V. S., & Kubes, P. (2019). Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. In *Blood* (Vol. 133, Issue 20, pp. 2178–2185). American Society of Hematology.
- Chen, G., Zhang, D., Fuchs, T. A., Manwani, D., Wagner, D. D., & Frenette, P. S. (2014). Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood*, *123*(24), 3818–3827.
- Cokic, V. P., Smith, R. D., Beleslin-Cokic, B. B., Njoroge, J. M., Miller, J. L., Gladwin, M. T., & Schechter, A. N. (2003). Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *Journal of Clinical Investigation*, *111*(2), 231–239.
- Connes, P., Verlhac, S., & Bernaudin, F. (2013). Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. In *British Journal of Haematology*, *161*(4)484–498).
- Davis, B. A., Allard, S., Qureshi, A., Porter, J. B., Pancham, S., Win, N., Cho, G., & Ryan, K. (2017). Guidelines on red cell transfusion in sickle cell disease. Part I: principles and laboratory aspects. *British Journal of Haematology*, *176*(2), 179–191.
- Kato, G. J., Hebbel, R. P., Steinberg, M. H., & Gladwin, M. T. (2009). Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *American Journal of Hematology*, *84*(9), 618–625.
- Kau, D. K., Finnegan, E., & Barabino, G. A. (2009). Sickle red cell-endothelium interactions. In *Microcirculation*, *16*(1), 97–111.
- Kinney, T. R., Helms, R. W., O’Branski, E. E., Ohene-Frempong, K., Wang, W., Daeschner, C., Vichinsky, E., Redding-Lallinger, R., Gee, B., Platt, O. S., & Ware, R. E. (1999). Safety of hydroxyurea in children with sickle cell anemia: Results of the HUG-KIDS study, a phase I/II trial. *Blood*, *94*(5), 1550–1554.
- Kinney, T. R., Sleeper, L. A., Wang, W. C., Zimmerman, R. A., Pegelow, C. H., Ohene-Frempong, K., Wethers, D. L., Bello, J. A., Vichinsky, E. P., Moser, F. G., Gallagher, D. M., DeBaun, M. R., Platt, O. S., & Miller, S. T. (1999). Silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: A risk factor analysis. *Pediatrics*, *103*(3), 640–645.
- Koehl, B., Nivoit, P., El Nemer, W. E., Lenoir, O., Hermand, P., Pereira, C., Brousse, V., Guyonnet, L., Ghinatti, G., Benkerrou, M., Colin, Y., Le van Kim, C., & Tharaux, P. L. (2017). The endothelin B receptor plays a crucial role in the adhesion of neutrophils to the endothelium in sickle cell disease. *Haematologica*, *102*(7), 1161–1172.
- Koehl, B., Sommet, J., Holvoet, L., Abdoul, H., Boizeau, P., Ithier, G., Missud, F., Couque,

- N., Verlhac, S., Voultoury, P., Sellami, F., Baruchel, A., & Benkerrou, M. (2016). Comparison of automated erythrocytapheresis versus manual exchange transfusion to treat cerebral macrovasculopathy in sickle cell anemia. *Transfusion*, *56*(5), 1121–1128.
- Lard, L. R., Mul, F. P. J., de Haas, M., Roos, D., & Duits, A. J. (1999). Neutrophil activation in sickle cell disease. *Journal of Leukocyte Biology*, *66*(3), 411–415.
- Letvin, N. L., Linch, D. C., Beardsley, G. P., McIntyre, K. W., & Nathan, D. G. (1984). Augmentation of Fetal-Hemoglobin Production in Anemic Monkeys by Hydroxyurea. *New England Journal of Medicine*, *310*(14), 869–873.
- Ohene-Frempong, K., Weiner, S. J., Sleeper, L. A., Miller, S. T., Embury, S., Moohr, J. W., Wethers, D. L., Pegelow, C. H., & Gill, F. M. (1998). Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: Rates and risk factors. *Blood*, *91*(1), 288–294.
- Piel, F. B., Hay, S. I., Gupta, S., Weatherall, D. J., & Williams, T. N. (2013). Global Burden of Sickle Cell Anaemia in Children under Five, 2010-2050: Modelling Based on Demographics, Excess Mortality, and Interventions. *PLoS Medicine*, *10*(7), e1001484.
- Saleh, A. W., Hillen, H. F. P., & Duits, A. J. (1999). Levels of endothelial, neutrophil and platelet-specific factors in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. *Acta Haematologica*, *102*(1), 31–37.
- Sommet, J., Alberti, C., Couque, N., Verlhac, S., Haouari, Z., Mohamed, D., François, M., Missud, F., Holvoet, L., Elmaleh, M., Ithier, G., Denjean, A., Elion, J., Baruchel, A., & Benkerrou, M. (2016). Clinical and haematological risk factors for cerebral macrovasculopathy in a sickle cell disease newborn cohort: a prospective study. *British Journal of Haematology*, *172*(6), 966–977.
- Switzer, J. A., Hess, D. C., Nichols, F. T., & Adams, R. J. (2006). Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. In *Lancet Neurology* (Vol. 5, Issue 6, pp. 501–512).
- Turhan, A., Weiss, L. A., Mohandas, N., Coller, B. S., & Frenette, P. S. (2002). Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: A new paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(5), 3047–3051.
- Yawn, B. P., Buchanan, G. R., Afenyi-Annan, A. N., Ballas, S. K., Hassell, K. L., James, A. H., Jordan, L., Lanzkron, S. M., Lottenberg, R., Savage, W. J., Tanabe, P. J., Ware, R. E., Murad, M. H., Goldsmith, J. C., Ortiz, E., Fulwood, R., Horton, A., & John-Sowah, J. (2014). Management of sickle cell disease: Summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. *Journal of the American Medical Association*, *312*, (10), 1033–1048.

- Zhang, D., Chen, G., Manwani, D., Mortha, A., Xu, C., Faith, J. J., Burk, R. D., Kunisaki, Y., Jang, J. E., Scheiermann, C., Merad, M., & Frenette, P. S. (2015). Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature*, *525*(7570), 528–532.
- Zhang, D., Xu, C., Manwani, D., & Frenette, P. S. (2016). Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood*, *127*(7), 801–809).

	No treatment	Hydroxycarbamide	Exchange transfusion		Erythrapheresis and Hydroxycarbamide
			Erythrapheresis	Manual exchange	
<i>n</i>	12	11	14	6	11
Age (years) median (IQ)	14.63 (4.62;17.0)	9.93 (7.96; 12.98)	13.52 (9.01;15.57)	4.40 (3.32;5.59)	12.12 (10.38;13.44)
Female (%)	6 (50%)	3 (27%)	6 (43%)	5 (83%)	6 (54%)
Abnormal intracranial TCD <i>n</i> (%)	-	-	0	2 (33%)	2 (18%)
Abnormal intracranial TCD and MRA <i>n</i> (%)	-	-	8 (57%)	0	8 (73%)
Abnormal cervical TCD and MRA <i>n</i> (%)	-	-	3 (21.5%)	1 (17%)	1 (9%)
Past history of stroke <i>n</i> (%)	-	-	3 (21.5%)	0	0
Duration of the exchange transfusion program (years)	-	-	4.33 (3.08;6.15)	0.96 (0.5;1.35)	4.95 (8.55;2.86)
Evolution of cerebral vasculopathy (improvement-stagnation-worsening, <i>n</i>%)	-	-	0 - 12(86%) -2(14%)	0 - 6(100%) - 0	4 (36%) - 6(55%) -1(9%)
Hb level (g/dl) median (IQ)	8.40 (7.83. 9.30)	8.90 (7.70. 9.20)	8.85 (8.53. 9.58)	9.30 (8.29; 9.58)	9.0 (8.50; 9.75)
reticulocytes count (109/L) median (IQ)	234 000 (195 280; 296 750)	229 850 (179 000; 264 180)	364 870** (302 250; 388 300)	346 900 (281 140; 370 000)	358 000* (295 520; 376 500)
platelet count (109/L) median (IQ)	346 000 (282 500; 379 000)	334 000 (253 000; 373 000)	384 000 (272 500; 496 750)	482 000 (307 000; 544 250)	385 000 (335 500; 520 500)
Leukocyte count (109/L) median (IQ)	12 036 (9 535; 13 127)	8 060* (7 300; 9 100)	13 160 (10 160; 15 282)	10 875 (9 357; 12 100)	10 240 (9 520; 11 170)
Neutrophil count (109/L) median (IQ)	5 591 (4 407; 6 275)	2 493** (1 842; 3 754)	7 599 (5 504; 9 152)	5 007 (3 433; 7 285)	4 534 (3 283; 7 001)
Monocyte count (109/L) median (IQ)	1 389 (957; 1389)	674** (502; 881)	1 250 (1 019; 1 712)	975 (769; 1 180)	988 (907; 1 221)

Table 1 : Clinical and Biological characteristics of the patients. Mann-Whitney test was used to compare the different groups; *, $p < 0.05$ compared with untreated SS patients; **, $p < 0.01$ compared with untreated SS patients.

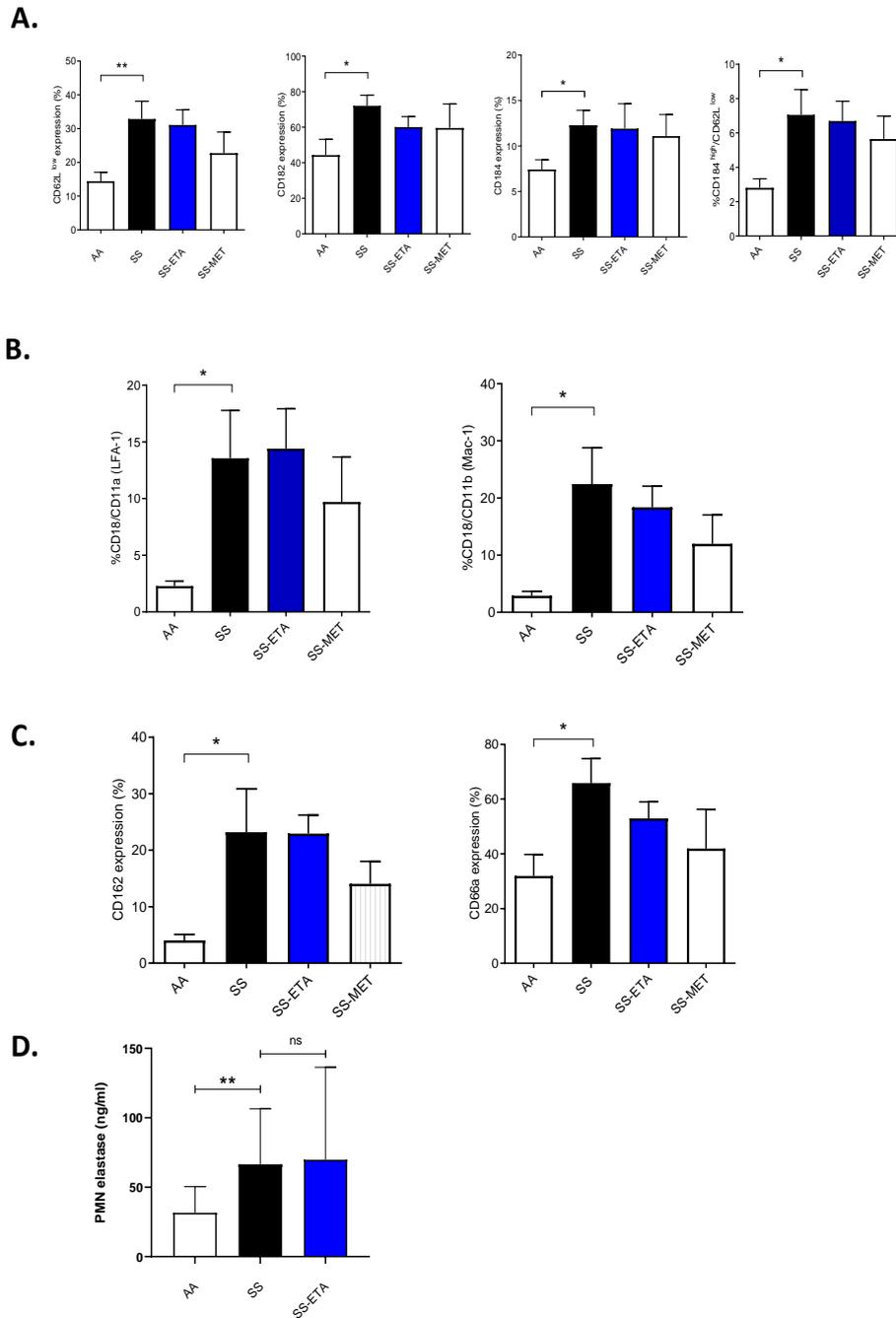


Figure 1 : Phenotypic Characteristics of neutrophils from healthy controls (AA), SCA patients (SS), SCA patients with erythrapheresis (SS-ETA) and SCA patients with manual exchange transfusion program (SS-MET). A: expression of age-markers CD62L, CD182, CD184 and the typical population of older neutrophils CD62^{Low}/CD184^{high}. **B:** expression of integrins LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18). **C:** expression of adhesion molecules CD162 and CD66a. **D:** plasmatic elastase level in 10 AA healthy controls, 14 SCA patients and 6 SCA patients with erythrapheresis. Mann-Whitney test was used to compare the different groups; *, p < 0.05 compared with untreated SS patients; **, p < 0.01 compared with untreated SS patients.

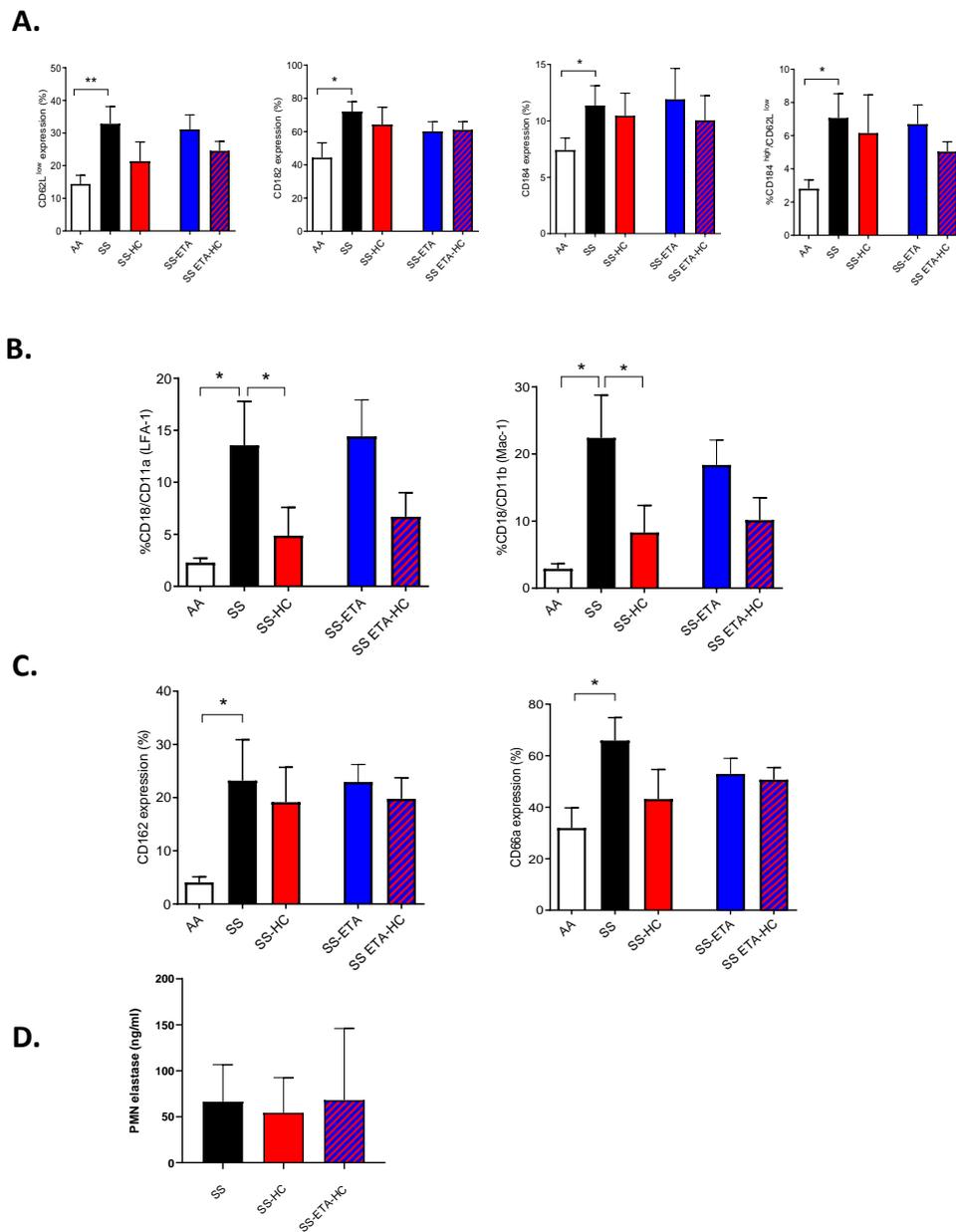


Figure 2 : Phenotypic Characteristics of neutrophils from healthy controls (AA), SCD patients (SS), SCD patients with Hydroxycarbamide treatment (SS-HC), SCD patients with erythrapheresis (SS-ETA) and SCD patients with both erythrapheresis program and Hydroxycarbamide treatment (SS-ETA-HC). A: expression of age-markers CD62L, CD182, CD184 and the typical population of older neutrophils CD62^{Low}/CD184^{high}. **B:** expression of integrins LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18). **C:** expression of adhesion molecules CD162 and CD66a. **D:** plasmatic elastase level in 14 SCA patients, 14 SCA patients with HC treatment and 9 SCA patients with both erythrapheresis and HC. Mann-Whitney test was used to compare the different groups; *, p < 0.05 compared with untreated SS patients; **, p < 0.01 compared with untreated SS patients.

Discussion générale et perspectives

La discussion détaillée des résultats des deux parties de notre travail est exposée dans les trois articles présentés dans ce mémoire et ne sera pas reprise ici. Seront plutôt présentés des éléments de discussion non abordés dans les articles ainsi que des considérations et/ou réflexions sur les difficultés méthodologiques rencontrées, sur la place de ce travail dans une coopération Sud-Sud et Nord-Sud équitable, sur le bénéfice d'une telle collaboration pour les partenaires du Nord comme du Sud ainsi que sur les moyens et les perspectives de valorisation de la démarche.

L'étude BIOCADRE a été menée dans deux populations géographiquement séparées. Dans un but d'homogénéisation, seuls des patients homozygotes SS ont été inclus, appariés en sexe et en âge. Nous observons que dans la population malienne la proportion de patients présentant une microalbuminurie est trois fois plus élevée que dans la population sénégalaise ; dans la population sénégalaise, la proportion de patients présentant une TRJV élevée est trois fois plus forte que dans la population malienne mais aussi les patients avec «aucune complication vasculaire» sont cinq fois plus nombreux. La présentation clinique semble donc notablement différente entre les deux groupes et si l'on se base sur le critère «aucune complication vasculaire» relativement moins sévère au Sénégal. Il peut y avoir plusieurs explications à cette observation. Il pourrait s'agir d'un «effet centre» où la définition ou l'appréciation des critères pour chaque complication sont différents entre Dakar et Bamako. Cette hypothèse est peu probable car TRJV et microalbuminurie sont des paramètres objectifs. De plus les équipes ayant recruté les patients et contrôlé les données ont une habitude d'échange et de travail en commun (> 5 ans au moment de l'inclusion des patients dans la cohorte BIOCADRE). La seconde hypothèse est l'origine géographique et environnementale des patients. Dakar au Sénégal et Bamako au Mali sont quasiment à la même latitude (2° de différence, Bamako étant 220 km plus au Sud que Dakar). Les deux

viles sont dans la même zone climatique sur la carte établie selon classification de Köppen-Geiger (Kottek et al., 2006). Cependant, en bord d’océan, Dakar a un climat relativement moins chaud que Bamako en situation continentale mais aussi paradoxalement moins humide et plus contrasté. La température annuelle moyenne est de 24,9° C à Dakar (variation saisonnière 6,4°C) et les précipitations annuelles de 469 mm concentrées sur 2 mois (Août-Septembre). Pour comparaison la température annuelle moyenne est de 27,8° C à Bamako (variation saisonnière 2,3°C) et les précipitations annuelles de 953 mm concentrées sur 4 mois (Juin-Septembre) (<https://en.climate-data.org>). Le GDP (*gross domestic product*) per capita était de 1521 USD au Sénégal en 2018 et au Mali de 899 USD (www.data.worldbank.org). Au-delà de ces éléments, il n’existe pas à notre connaissance de données documentées sur les différences de mode de vie entre les deux pays. Le tout est en faveur de conditions environnementales relativement plus favorables au Sénégal qu’au Mali. Il pourrait bien sûr aussi s’agir d’une différence du fond génétique entre les deux populations. On pense tout d’abord à une différence de distribution des haplotypes β -globine, l’haplotype Sénégal (SEN) ayant été décrit comme associé à une forme moins sévère de la maladie (Nagel et al., 1985). De fait, la fréquence allélique du polymorphisme rs7482144 A (spécifique de l’haplotype SEN) est différente entre les deux groupes. Elle est de 0,79 dans le groupe sénégalais et de 0,49 dans le groupe malien (chiffres calculés à partir des données rapportées dans l’article 1). Ces données sont en accord avec les résultats de la littérature pour la fréquence allélique de l’haplotype SEN chez les patients drépanocytaires au Sénégal (Nagel et al., 1985; Gueye Tall et al., 2017). Parcontre, les deux groupes ne se différencient pas sur la fréquence de l’association à un déterminant α -thalassémique ni par le taux d’HbF, deux facteurs d’atténuation connus (article 1 Supplemental Table 1 et Table 1). Au vu des données énoncées ci-dessus, c’est-à-dire un environnement et des fréquences haplotypiques différents, on peut s’interroger sur la légitimité d’avoir regroupé les deux

populations dans l'analyse des données proposée pour publication. Ce choix a été dicté par le fait que l'analyse indépendante des deux populations a bien été réalisée et a donné les mêmes résultats, mais évidemment avec une puissance de significativité moins forte vu le nombre de patients. Nous avons donc choisi de présenter des résultats présentant la plus forte puissance en terme statistique.

Les difficultés pratiques à réaliser cette première partie du travail amènent à s'interroger sur l'utilité de mener des études translationnelles de haut niveau de sophistication en Afrique. La justification se situe à plusieurs niveaux. Comme déjà mentionné, l'histoire naturelle de la maladie a été établie dans les pays du Nord (États-Unis et Europe) et très peu est connu de l'histoire naturelle dans les pays d'endémie. Pour donner des exemples manifestes, la description «classique» de la drépanocytose rapporte une atrophie de la rate, et pourtant nos collègues d'Afrique Centrale décrivent des patients porteurs de splénomégalie probablement à rapporter aux interactions avec le paludisme, mais dont la pathogénie n'est en fait pas précisée (Ware et al., 2017). Ces mêmes collègues décrivent des épistaxis «torrentielles» alors que nous avons insisté sur un état pro-coagulant dans notre description de la maladie. Une description détaillée est nécessaire mais non suffisante car les données physiopathologiques, nécessitant des abords de haute technicité, sont essentielles à la mise en place de prises en charges raisonnées et au mieux adaptées dans ces régions du monde. Comme précédemment indiqué, à la fois l'environnement et le fond génétique participent à cette variabilité. Sur le 1er point les études sont encore balbutiantes. Concernant le second, abordé dans notre travail, il est important de mentionner que les données actuelles proviennent de populations d'origine africaine hautement mélangées aux Amériques (États-Unis, Caraïbes, Brésil), un peu moins en Europe, et ne sont donc pas directement applicables à des populations génétiquement assez homogènes mais différentes selon les régions en Afrique ou en Inde. Documenter cet aspect en Afrique est donc crucial. L'établissement et

le suivi de de grandes cohortes de patients, comme la cohorte CADRE préceuseure et la cohorte SPARCO (*Sickle Pan-African Research Consortium*, www.sickleinafrica.org) en cours de constitution doivent jeter les bases d'une description de référence de la drépanocytose en Afrique comme l'ont fait les cohortes historiques : la Jamaican Cohort Study dans les Caraïbes et la CSSCD (Cooperative Study of Sickle Cell Disease) aux États-Unis (Serjeant et al., 1981; Gill et al., 1995) . Faut-il ajouter que la formation des praticiens et biologistes des pays du Sud est instrumentale dans l'implantation dans ces pays de centres de référence de prise en charge, de formation et de recherche. Cette implantation implique des transferts de technologies robustes, mais aussi des techniques de pointe judicieusement choisies. C'est aussi à partir de ces centres que doit se faire la sensibilisation des populations et des décideurs afin de développer et de financer des programmes nationaux vigoureux face à un problème de santé publique majeur mais le plus souvent encore délaissé. Les collaborations Sud-Nord et de plus en plus Sud-Sud en sont les outils. Le partage des bénéfices est le garant de l'efficacité et surtout de l'aspect durable de la collaboration. Si le bénéfice pour les pays du Sud est assez évident, il doit être clair également que les pays du Nord bénéficient des données acquises pour une compréhension plus précise de la variabilité de la maladie, de l'influence des facteurs environnementaux et génétiques, et *in fine* pour la prise en charge des patients au Nord, en particuliers dans leurs groupes de migrants. La formation et la recherche sont clairement des moteurs de progrès par la méthodologie d'action et par la motivation qu'elles apportent à un personnel médical susceptible de se lasser du fait du poids de la charge clinique et des difficultés matérielles et administratives rencontrées. Enfin, il est clair que le transfert et la mise en œuvre de savoir-faire, de technologie(s) et de stratégie(s) de prise en charge des patients dans des conditions adaptées à un environnement spécifique, qui représentent mes perspectives immédiates, nécessitent une approche réfléchie qui s'apparente à la réflexion d'une démarche de recherche. Ce

dernier aspect d'ailleurs est en train de se structurer en une vraie «science de l'application» (ou *implementation science*) (Bauer et al., 2015).

Dans la 2^{ème} partie de notre travail, nous montrons que les PNN restent dans un état activé et présentent un phénotype «agé» chez les enfants en programme d'échange transfusionnel pour la prise en charge d'une vasculopathie cérébrale. Il a été démontré que le vieillissement des PNN est sous la dépendance du microbiome *via* la voie du TLR-4. L'abrogation de la flore intestinale chez la souris réduit considérablement le nombre de neutrophiles âgés en circulation et améliore la pathologie et les lésions organiques liées à l'inflammation dans les modèles de drépanocytose (Zhang et al., 2015). Ce n'est que très récemment qu'on a réalisé que les phénomènes d'ischémie dans la circulation splanchnique affectent également la muqueuse intestinale comme le montrent des taux plasmatiques élevés du marqueur de lésion des entérocytes iFABP (*serum intestinal fatty-acid-binding protein*) chez des sujets drépanocytaires. Il en résulte une translocation accrue des microbes et des PAMPs intestinaux vers la circulation sanguine où ils participent alors à une activation et un vieillissement accru des PNN (Dutta et al., 2019). D'autres travaux ont également montré une modification quantitative et qualitative de la flore intestinale du sujet drépanocyttaire (Lim et al., 2018). Ces observations sont particulièrement intéressantes car elles ont identifié une cible thérapeutique potentielle non encore explorée dans la drépanocytose en général, et encore moins dans l'évolution de la vasculopathie cérébrale malgré le régime d'échange transfusionnel où notre étude suggère fortement le rôle des PNN activés. Des approches à explorer pourraient viser à diminuer la densité microbienne ou à rétablir une flore qualitativement normale (Dutta et al., 2020).

Dès le diagnostic, les enfants drépanocytaires sont mis sous prophylaxie par la pénicilline orale pour prévenir les complications infectieuses sévères et ceci au moins jusqu'à l'âge de 5 ans (recommandations de la Haute Autorité de Santé - HAS, [www.has-](http://www.has-sante.fr)

[sante.fr/jcms/c_272479/fr/prise-en-charge-de-la-drepanocytose-chez-l-enfant-et-l-](https://sante.fr/jcms/c_272479/fr/prise-en-charge-de-la-drepanocytose-chez-l-enfant-et-l-adolescent)

[adolescent](https://sante.fr/jcms/c_272479/fr/prise-en-charge-de-la-drepanocytose-chez-l-enfant-et-l-adolescent)). Les conséquences de ce traitement sur la flore intestinale, à notre connaissance, n'ont pas été investiguées, ni pendant le traitement en comparaison avec des enfants normaux non traités ni avant et après l'arrêt de la prophylaxie. Il est possible qu'au-delà de son effet préventif du risque infectieux, le traitement ait aussi un effet bénéfique général sur les autres manifestations de la maladie. Si cela était vrai, se poserait alors la question de sa poursuite au-delà de l'âge de 5 ans. Cette hypothèse est néanmoins peu probable au vu du spectre de la pénicilline orale. Un traitement des souris drépanocytaires par une combinaison ampicilline/ néomycine/ vancomycine/ métronidazole a montré une protection contre les VOC induites par le TNF- α (Zhang et al., 2015). Un traitement sur le long terme des patients drépanocytaires avec cette combinaison d'antibiotiques semble peu réalisable. Cependant une étude de Phase II utilisant la rifaximine orale, couramment utilisée sur le long terme dans d'autres indications, montre une diminution significative des PNN «CD62L^{low}/CD184^{high}» (Dutta et al., 2019).

La seconde possibilité serait de rétablir une flore intestinale normale. Bien qu'on ne dispose à ce jour d'aucune preuve de l'effet potentiellement bénéfique d'une telle approche dans la drépanocytose, les moyens de le tester existent et sont déjà utilisés dans le traitement d'autres pathologies. On pourrait par exemple tester l'effet de probiotiques ou bien de celui d'une transplantation de microbiote fécal (FMT). La FMT répétée est une option cliniquement applicable car elle peut maintenant être réalisée à l'aide de capsules orales contenant un microbiote fécal normal.

Il s'agit donc de voies nouvelles intéressantes à explorer dans la drépanocytose en général et en complément de la transfusion dans la vasculopathie cérébrale.

Références bibliographiques

- Adesina, O. O., & Neumayr, L. D. (2019). Osteonecrosis in sickle cell disease: An update on risk factors, diagnosis, and management. *Hematology (United States)*, 2019(1), 351–358.
- Adeyoku, A. B., Olujohungbe, A. B. K., Morris, J., Yardumian, A., Bareford, D., Akenova, A., ... O'Reilly, P. H. (2002). Priapism in sickle-cell disease; incidence, risk factors and complications - An international multicentre study. *BJU International*, 90(9), 898–902.
- Agrawal, R. K., Patel, R. K., Shah, V., Nainiwal, L., & Trivedi, B. (2014). Hydroxyurea in sickle cell disease: Drug review. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 30(2): 91–96
- Akinsheye, I., Alsultan, A., Solovieff, N., Ngo, D., Baldwin, C. T., Sebastiani, P., ... Steinberg, M. H. (2011). Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*, 118(1): 19–27.
- Alayash, A. I. (2018). Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 70:78–86.
- AlFadhli, S., Al-Jafer, H., Hadi, M., Al-Mutairi, M., & Nizam, R. (2013). The effect of UGT1A1 promoter polymorphism in the development of hyperbilirubinemia and cholelithiasis in hemoglobinopathy patients. *PloS One*, 8(10), 77681.
- Allali, S., Maciel, T. T., Hermine, O., & De Montalembert, M. (2020). Innate immune cells, major protagonists of sickle cell disease pathophysiology. *Haematologica*, 105(2):273–283.
- Allison, A. C. (1954). Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *British Medical Journal*, 1(4857), 290–294.
- Alonso, D., & Radomski, M. W. (2003). The nitric oxide-endothelin-1 connection. *Heart Failure Reviews*, 8(1):107–15.
- Anele, U. A., Le, B. V., Resar, L. M. S., & Burnett, A. L. (2015). How I treat priapism. *Blood*, 125(23), 3551–3558.
- Ansari, J., & Gavins, F. N. E. (2019). Ischemia-Reperfusion Injury in Sickle Cell Disease: From Basics to Therapeutics. *American Journal of Pathology*, 189(4):706–718

- Ataga, K. I., Moore, C. G., Hillery, C. A., Jones, S., Whinna, H. C., Strayhorn, D., ... Orringer, E. P. (2008). Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. *Haematologica*, *93*(1), 20–26.
- Ataga, K. I., Reid, M., Ballas, S. K., Yasin, Z., Bigelow, C., James, L. S., ... Stocker, J. W. (2011). Improvements in haemolysis and indicators of erythrocyte survival do not correlate with acute vaso-occlusive crises in patients with sickle cell disease: A phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study of the gardos channel blocker senicapoc (ICA-17043). *British Journal of Haematology*, *153*(1), 92–104.
- Barabino, G. A., McIntire, L. V., Eskin, S. G., Sears, D. A., & Udden, M. (1987). Endothelial cell interactions with sickle cell, sickle trait, mechanically injured, and normal erythrocytes under controlled flow. *Blood*, *70*(1), 152–157.
- Bartolucci, P., Brugnara, C., Teixeira-Pinto, A., Pissard, S., Moradkhani, K., Jouault, H., & Galacteros, F. (2012). Erythrocyte density in sickle cell syndromes is associated with specific clinical manifestations and hemolysis. *Blood*, *120*(15), 3136–3141.
- Bauer, M. S., Damschroder, L., Hagedorn, H., Smith, J., & Kilbourne, A. M. (2015). An introduction to implementation science for the non-specialist. *BMC Psychology*, *3*(1), 1–12.
- Belcher, J. D., Chen, C., Nguyen, J., Milbauer, L., Abdulla, F., Alayash, A. I., ... Vercellotti, G. M. (2014). Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood*, *123*(3), 377–390.
- Belcher, J. D., Mahaseth, H., Welch, T. E., Vilback, A. E., Sonbol, K. M., Kalambur, V. S., ... Vercellotti, G. M. (2005). Critical role of endothelial cell activation in hypoxia-induced vasoocclusion in transgenic sickle mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *288*(6), H2715-25.
- Benkerrou, M., Delarche, C., Brahimi, L., Fay, M., Vilmer, E., Elion, J., ... Elbim, C. (2002). Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H₂O₂ production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. *Blood*, *99*(7), 2297–2303.
- Bennewitz, M. F., Jimenez, M. A., Vats, R., Tutuncuoglu, E., Jonassaint, J., Kato, G. J., ... Sundd, P. (2017). Lung vaso-occlusion in sickle cell disease mediated by arteriolar

- neutrophil-platelet microemboli. *JCI Insight*, 2(1):e89761.
- Bernaudin, F., & Dhedin, N. (2016). Greffe dans la drépanocytose : Résultats, indications et perspectives. *Hematologie*, 22(2):117–134
- Beutler, E., & Flanagan, C. L. (1955). Effect of Sickle-Cell Trait on Resistance to Malaria. *British Medical Journal*, 1(4923), 1189–1191.
- Booth, C., Inusa, B., & Obaro, S. K. (2010). Infection in sickle cell disease: A review. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(1):e2–e12.
- Bridges, K. R., Barabino, G. D., Brugnara, C., Cho, M. R., Christoph, G. W., Dover, G., ... Eaton, W. A. (1996). A multiparameter analysis of sickle erythrocytes in patients undergoing hydroxyurea therapy. *Blood*, 88(12), 4701–4710.
- Brugnara, C., & Tosteson, D. C. (1987). Cell volume, K transport, and cell density in human erythrocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 252(3).
- Brugnara, C., Van Ha, T., & Tosteson, D. C. (1989). Role of chloride in potassium transport through a K-Cl cotransport system in human red blood cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 256(5).
- Brugnara, Carlo. (2018). Sickle cell dehydration: Pathophysiology and therapeutic applications. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 68(2–3), 187–204.
- Bunn, H. F. (1997). Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, 337(11):762–9.
- Bunn HF & Forget BG (1986). Hemoglobin : Molecular, genetic and clinical aspects. Texte book, Philadelphia: W. B. Saunders Company.690 pp.
- Bunn, H. F., Nathan, D. G., Dover, G. J., Hebbel, R. P., Platt, O. S., Rosse, W. F., & Ware, R. E. (2010). Pulmonary hypertension and nitric oxide depletion in sickle cell disease. *Blood*, 116(5):687–92.
- Camus, S. M., Gausserès, B., Bonnin, P., Loufrani, L., Grimaud, L., Charue, D., ... Blanc-Brude, O. P. (2012). Erythrocyte microparticles can induce kidney vaso-occlusions in a murine model of sickle cell disease. *Blood*, 120(25), 5050–5058.
- Canalli, A. A., Proença, R. F., Franco-Penteado, C. F., Traina, F., Sakamoto, T. M., Saad, S. T. O., ... Costa, F. F. (2011). Participation of Mac-1, LFA-1 and VLA-4 integrins in

- the in vitro adhesion of sickle cell disease neutrophils to endothelial layers, and reversal of adhesion by simvastatin. *Haematologica*, 96(4), 526–533.
- Carpenter, S. L., Lieff, S., Howard, T. A., Eggleston, B., & Ware, R. E. (2008). UGT1A1 promoter polymorphisms and the development of hyperbilirubinemia and gallbladder disease in children with sickle cell anemia. *American Journal of Hematology*, 83(10), 800–803.
- Cartron, J. P., & Elion, J. (2008). Erythroid adhesion molecules in sickle cell disease: Effect of hydroxyurea. *Transfusion Clinique et Biologique*, 15(1–2), 39–50.
- Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., ... Leboulch, P. (2010). Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature*, 467(7313), 318–322.
- Champion, H. C., Bivalacqua, T. J., Takimoto, E., Kass, D. A., & Burnett, A. L. (2005). Phosphodiesterase-5A dysregulation in penile erectile tissue is a mechanism of priapism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), 1661–1666.
- Charache, S., Grisolia, S., Fiedler, A. J., & Hellegers, A. E. (1970). Effect of 2,3-diphosphoglycerate on oxygen affinity of blood in sickle cell anemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 49(4), 806–812.
- Charache, Samuel, Terrin, M. L., Moore, R. D., Dover, G. J., Barton, F. B., Eckert, S. V., & Bonds, D. R. (1995). Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *New England Journal of Medicine*, 332(20), 1317–1322.
- Chen, G., Zhang, D., Fuchs, T. A., Manwani, D., Wagner, D. D., & Frenette, P. S. (2014). Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood*, 123(24), 3818–3827.
- Connes, P., Verlhac, S., & Bernaudin, F. (2013). Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*. Br J Haematol, 161(4):484–98.
- Conran, N., & Belcher, J. D. (2018). Inflammation in sickle cell disease. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 68(2–3), 263–299.
- Corvest, V., Blais, S., Dahmani, B., De Tersant, M., Etienney, A. C., Maroni, A., ...

- Pondarré, C. (2018). Cerebral vasculopathy in children with sickle cell disease: Key issues and the latest data. *Archives de Pédiatrie*, 25(1):63–7
- Couque, N., Trawinski, E., & Elion, J. (2016). Génétique des maladies de l'hémoglobine. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2016(481), 49–60.
- Dagur, P. K., McCoy, J. P., Nichols, J., Mendelsohn, L., Seamon, C., Kato, G. J., & van Beers, E. J. (2018). Haem augments and iron chelation decreases toll-like receptor 4 mediated inflammation in monocytes from sickle cell patients. *British Journal of Haematology*, 181(4): 552–554.
- Daniel, Y., Elion, J., Allaf, B., Badens, C., Bouva, M., Brincat, I., ... Lobitz, S. (2019). Newborn Screening for Sickle Cell Disease in Europe. *International Journal of Neonatal Screening*, 5(1), 15.
- Darbari, D. S., Sheehan, V. A., & Ballas, S. K. (2020). The vaso-occlusive pain crisis in sickle cell disease: Definition, pathophysiology, and management. *European Journal of Haematology*, 105(3):237–246
- Day, T. G., Drasar, E. R., Fulford, T., Sharpe, C. C., & Thein, S. L. (2012). Association between hemolysis and albuminuria in adults with sickle cell anemia. *Haematologica*, 97(2), 201–205.
- De Franceschi, L., Bachir, D., Galacteros, F., Tchernia, G., Cynober, T., Alper, S., ... Brugnara, C. (1997). Oral magnesium supplements reduce erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *Journal of Clinical Investigation*, 100(7), 1847–1852.
- Demirci, S., Uchida, N., & Tisdale, J. F. (2018). Gene therapy for sickle cell disease: An update. *Cytotherapy*. 20(7): 899–910.
- Desai, P. C., & Ataga, K. I. (2013). The acute chest syndrome of sickle cell disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 14(8):991–9.
- Diallo, D. A. (2013). The Centre for Research and Fight against Sickle Cell Disease (CRLD) in Bamako: An example of North-South public-private partnerships. *Bulletin de l'Academie Nationale de Medecine*, 197(6), 1221–1223.
- Duan, X. J., Lanzkron, S., Linz, M. O., Ewing, C., Wang, J., & Scott, A. W. (2019). Clinical and Ophthalmic Factors Associated With the Severity of Sickle Cell Retinopathy. *American Journal of Ophthalmology*, 197, 105–113.

- Dubert, M., Elion, J., Tolo, A., Diallo, D. A., Diop, S., Diagne, I., ... Ranque, B. (2017). Degree of anemia, indirect markers of hemolysis, and vascular complications of sickle cell disease in Africa. *Blood*, *130*(20), 2215–2223.
- Durpès, M. C., Nebor, D., du Mesnil, P. C., Mougengel, D., Decastel, M., Elion, J., & Hardy-Dessources, M. D. (2010). Effect of interleukin-8 and RANTES on the Gardos channel activity in sickle human red blood cells: Role of the Duffy antigen receptor for chemokines. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *44*(4), 219–223.
- Dutra, F. F., Alves, L. S., Rodrigues, D., Fernandez, P. L., De Oliveira, R. B., Golenbock, D. T., ... Bozza, M. T. (2014). Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(39), E4110–E4118.
- Dutta, D., Aujla, A., Knoll, B. M., & Lim, S. H. (2020). Intestinal pathophysiological and microbial changes in sickle cell disease: Potential targets for therapeutic intervention. In *British Journal of Haematology* (Vol. 188, Issue 4, pp. 488–493).
- Dutta, D., Methe, B. A., Morris, A., & Lim, S. H. (2019). Effects of rifaximin on circulating aged neutrophils in sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, *94*(6), E175–E176.
- Dutta, D., Methe, B., Amar, S., Morris, A., & Lim, S. H. (2019). Intestinal injury and gut permeability in sickle cell disease. *Journal of Translational Medicine*, *17*(1), 183.
- Eke, C. B., Okafor, H. U., & Ibe, B. C. (2012). Prevalence and correlates of microalbuminuria in children with sickle cell anaemia: Experience in a tertiary health facility in Enugu, Nigeria. *International Journal of Nephrology*, *2012*:240173.
- El-Haj, N., & Hoppe, C. (2018). Newborn Screening for SCD in the USA and Canada. *International Journal of Neonatal Screening*, *4*(4), 36.
- Elion, J., & Labie, D. (1996). Bases physiopathologiques moléculaires et cellulaires du traitement de la drépanocytose. *Hématologie*, *2*(6), 499–510.
- Elmariah, H., Garrett, M. E., De Castro, L. M., Jonassaint, J. C., Ataga, K. I., Eckman, J. R., ... Telen, M. J. (2014). Factors associated with survival in a contemporary adult sickle cell disease cohort. *American Journal of Hematology*, *89*(5), 530–535.

- Embury, S. H., Clark, M. R., Monroy, G., & Mohandas, N. (1984). Concurrent sickle cell anemia and α -thalassemia. Effect of pathological properties of sickle erythrocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 73(1), 116–123.
- Emmel, V. E. (1917). A study of the erythrocytes in a case of severe anemia with elongated and sickle-shaped red blood corpuscles. *Archives of Internal Medicine*, XX(4), 586-NP.
- Emond, A. M., Collis, R., Darvill, D., Higgs, D. R., Maude, G. H., & Serjeant, G. R. (1985). Acute splenic sequestration in homozygous sickle cell disease: Natural history and management. *The Journal of Pediatrics*, 107(2), 201–206.
- Ergul, S., Brunson, C. Y., Hutchinson, J., Tawfik, A., Kutlar, A., Webb, R. C., & Ergul, A. (2004). Vasoactive factors in sickle cell disease: In vitro evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction. *American Journal of Hematology*, 76(3), 245–251.
- Espinosa, G., López Farré, A., Cernadas, M. R., Manzarbeitia, F., Tan, D., Digiuni, E., ... Caramelo, C. (1996). Role of endothelin in the pathophysiology of renal ischemia-reperfusion in normal rabbits. *Kidney International*, 50(3), 776–782.
- Fabry, M. E., & Nagel, R. L. (1982). Heterogeneity of red cells in the sickler: a characteristic with practical clinical and pathophysiological implications. *Blood Cells*, 8(1):9–15.
- Feeling-Taylor, A. R., Yau, S. T., Petsev, D. N., Nagel, R. L., Hirsch, R. E., & Vekilov, P. G. (2004). Crystallization mechanisms of hemoglobin C in the R state. *Biophysical Journal*, 87(4), 2621–2629.
- Ferrone, F. A. (2015). The delay time in sickle cell disease after 40 years: A paradigm assessed. *American Journal of Hematology*, 90(5):438–45.
- Fertrin, K. Y., Melo, M. B., Assis, Â. M., Saad, S. T. O., & Costa, F. F. (2003). UDP-glucuronosyltransferase 1 gene promoter polymorphism is associated with increased serum bilirubin levels and cholecystectomy in patients with sickle cell anemia. *Clinical Genetics*, 64(2):160–2
- Fox, B. M., & Kasztan, M. (2016). Endothelin receptor antagonists in sickle cell disease: A promising new therapeutic approach. *Life Sciences*, 159, 15–19.
- Frenette, P. S. (2002). Sickle cell vaso-occlusion: Multistep and multicellular paradigm. *Current Opinion in Hematology*, 9(2):101–6.

- Fuchs, T. A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D. D., ... Wagner, D. D. (2010). Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(36), 15880–15885.
- Gainé, S. (2000). Pulmonary hypertension. *Journal of the American Medical Association*, 284(24), 3160–3168.
- Gárdos, G. (1958). The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, 30(3), 653–654.
- Garnier, Y., Ferdinand, S., Garnier, M., Cita, K.-C., Hierso, R., Claes, A., ... Romana, M. (2020). Plasma microparticles of sickle patients during crisis or taking hydroxyurea modify endothelium inflammatory properties. *Blood*, 136 (2): 247–256.
- Gaston, M. H., Verter, J. I., Woods, G., Pegelow, C., Kelleher, J., Presbury, G., ... Falletta, J. M. (1986). Prophylaxis with Oral Penicillin in Children with Sickle Cell Anemia. *New England Journal of Medicine*, 314(25), 1593–1599.
- Genovese, G., Friedman, D. J., Ross, M. D., Lecordier, L., Uzureau, P., Freedman, B. I., ... Pollak, M. R. (2010). Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. *Science*, 329(5993), 841–845.
- Gill, F. M., Sleeper, L. A., Weiner, S. J., Brown, A. K., Bellevue, R., Grover, R., ... Vichinsky, E. (1995a). Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. *Blood*, 86(2), 776–783.
- Gill, F. M., Sleeper, L. A., Weiner, S. J., Brown, A. K., Bellevue, R., Grover, R., ... Vichinsky, E. (1995). Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. *Blood*, 86(2), 776–783.
- Gladwin, M. T., & Vichinsky, E. (2008). Pulmonary complications of sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, 359:2254–2265
- Gluckman, E., Cappelli, B., Bernaudin, F., Labopin, M., Volt, F., Carreras, J., ... Chaudhury, S. (2017). Sickle cell disease: An international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 129(11): 1548–1556.
- Goldberg, M. F. (1971). Classification and pathogenesis of proliferative sickle retinopathy. *American Journal of Ophthalmology*, 71(3), 649–665.

- Gueye Tall, F., Martin, C., Malick Ndour, E. H., Dème Ly, I., Renoux, C., Chillotti, L., ... Joly, P. (2017). Genetic Background of the Sickle Cell Disease Pediatric Population of Dakar, Senegal, and Characterization of a Novel Frameshift β -Thalassemia Mutation [HBB: c.265_266del; p.Leu89Glufs*2]. *Hemoglobin*, 41(2), 89–95.
- Guillon, C. (2016). *La vasculopathie cérébrale de l'enfant drépanocytaire Cerebral vasculopathy in pediatric sickle cell disease. La Lettre du Neurologue*, Vol. XX - n° 5.
- Hahn, E. V., & Gillespie, E. B. (1927). Sickle cell anemia: Report of a case greatly improved by splenectomy. experimental study of sickle cell formation. *Archives of Internal Medicine*, 39(2), 233–254.
- Ham, T. H., & Castle, W. B. (1940). Studies on Destruction of Red Blood Cells: Relation of Increased Hypotonic Fragility and of Erythro-Stasis to the Mechanism of Hemolysis in Certain Anemias. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 82(4): 411–419.
- Haverfield, E. V., McKenzie, C. A., Forrester, T., Bouzekri, N., Harding, R., Serjeant, G., ... Weatherall, D. J. (2005). UGT1A1 variation and gallstone formation in sickle cell disease. *Blood*, 105(3), 968–972.
- Hayes, M. M., Vedamurthy, A., George, G., Dweik, R., Klings, E. S., Machado, R. F., ... Thomson, C. C. (2014). Pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Annals of the American Thoracic Society*, 11(9): 1488–1489.
- Hebbel, R. P. (2003). Sickle hemoglobin instability: a mechanism for malarial protection. *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, 8(5), 238–240.
- Hebbel, R. P., Boogaerts, M. A. B., Eaton, J. W., Steinberg, M. H., & Hebbel, R. P. (1980). Erythrocyte Adherence to Endothelium in Sickle-Cell Anemia: A Possible Determinant of Disease Severity. *New England Journal of Medicine*, 302(18), 992–995.
- Hebbel, R. P., Elion, J., & Kutlar, A. (2018). The missing middle of sickle therapeutics: Multi-agent therapy, targeting risk, using biomarkers. *American Journal of Hematology*, 93(12), 1439–1443.
- Hebbel, R. P., & Key, N. S. (2016). Microparticles in sickle cell anaemia: promise and pitfalls. *British Journal of Haematology*, 174(1), 16–29.
- Hebbel, R. P., Osarogiagbon, R., & Kaul, D. (2004). The endothelial biology of sickle cell disease: Inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation*, 11(2):129–51.

- Hebbel, R. P., & Vercellotti, G. M. (1997). The endothelial biology of sickle cell disease. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 129(3) 288–293
- Herrick, J. B. (1910). Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Archives of Internal Medicine*, VI(5), 517–521.
- Hoban, M. D., Orkin, S. H., & Bauer, D. E. (2016). Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease. *Blood*, 18(2): 139–158.
- Ingram, V. M. (1956). A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anæmia hæmoglobin. *Nature*, 178(4537), 792–794.
- Joneckis, C., Ackley, R., Orringer, E., Wayner, E., & Parise, L. (1993). Integrin alpha 4 beta 1 and glycoprotein IV (CD36) are expressed on circulating reticulocytes in sickle cell anemia. *Blood*, 82(12), 3548–3555.
- Jones, K. M., Niaz, M. S., Brooks, C. M., Roberson, S. I., Aguinaga, M. P., Hills, E. R., ... Archibong, A. E. (2009). Adverse Effects of a Clinically Relevant Dose of Hydroxyurea Used for the Treatment of Sickle Cell Disease on Male Fertility Endpoints. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(3), 1124–1144.
- Kao, W. H. L., Klag, M. J., Meoni, L. A., Reich, D., Berthier-Schaad, Y., Li, M., ... Parekh, R. S. (2008). MYH9 is associated with nondiabetic end-stage renal disease in African Americans. *Nature Genetics*, 40(10), 1185–1192.
- Kassogu , A., Coulibaly, M., Ouattara, Z., Diarra, A., Tembely, A., El Fassi, M. J., ... Ouattara, K. (2014). Aspects cliniques et thérapeutiques du priapisme au CHU gabriel tour :  tude de 36 cas. *Pan African Medical Journal*, 17, 1937–8688.
- Kato, G. J. (2012). Priapism in Sickle-Cell Disease: A Hematologist’s Perspective. *Journal of Sexual Medicine*, 9(1), 70–78.
- Kato, G. J., Steinberg, M. H., & Gladwin, M. T. (2017). Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *Journal of Clinical Investigation*, 127(3): 750–760.
- Kaul, D. K., Fabry, M. E., & Nagel, R. L. (1989). Microvascular sites and characteristics of sickle cell adhesion to vascular endothelium in shear flow conditions: Pathophysiological implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

the United States of America, 86(9), 3356–3360.

- Knox-Macaulay, H. H. M., Ahmed, M. M., Gravell, D., Al-Kindi, S., & Ganesh, A. (2007). Sick cell-haemoglobin E (HbSE) compound heterozygosity: A clinical and haematological study. *International Journal of Laboratory Hematology*, 29(4), 292–301.
- Koehl, B., Nivoit, P., El Nemer, W. E., Lenoir, O., Hermand, P., Pereira, C., ... Tharaux, P. L. (2017). The endothelin B receptor plays a crucial role in the adhesion of neutrophils to the endothelium in sickle cell disease. *Haematologica*, 102(7), 1161–1172.
- Konoty-Ahulu, F. I. D. (1991). Penicillin prophylaxis in children with sickle cell disease [4]. *British Medical Journal*, 302:989
- Kopp, J. B., Smith, M. W., Nelson, G. W., Johnson, R. C., Freedman, B. I., Bowden, D. W., ... Winkler, C. A. (2008). MYH9 is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Genetics*, 40(10), 1175–1184.
- Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B., & Rubel, F. (2006). World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift*, 15(3), 259–263.
- Kwiatkowski, J. L., & Cohen, A. R. (2004). Iron chelation therapy in sickle-cell disease and other transfusion-dependent anemias. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 18(6), 1355–1377.
- Labie, D., & Elion, J. (2006). Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC - Hématologie*, 1(1), 1–15.
- Labie, D., Pagnier, J., Lapoumeroulie, C., Rouabhi, F., Dunda-Belkhodja, O., Chardin, P., ... Nagel, R. L. (1985). Common haplotype dependency of high (G) γ -globin gene expression and high Hb F levels in β -thalassemia and sickle cell anemia patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(7), 2111–2114.
- Lell, B., Mordmüller, B., Agobe, J. C. D., Honkpehedji, J., Zinsou, J., Boex Mengue, J., ... Kremsner, P. G. (2018). Impact of sickle cell trait and naturally acquired immunity on uncomplicated malaria after controlled human malaria infection in adults in Gabon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(2), 508–515.
- Lemonne, N., Lamarre, Y., Romana, M., Mukisi-Mukaza, M., Hardy-Dessources, M. D.,

- Tarer, V., ... Connes, P. (2013). Does increased red blood cell deformability raise the risk for osteonecrosis in sickle cell anemia? *Blood*, 121(15): 3054–6.
- Lim, S. H., Morris, A., Li, K., Fitch, A. C., Fast, L., Goldberg, L., ... Methé, B. (2018). Intestinal microbiome analysis revealed dysbiosis in sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, 93(4), E91–E93.
- López Farré, A., Riesco, A., Espinosa, G., Digiuni, E., Cernadas, M. R., Alvarez, V., ... Egido, J. (1993). Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. *Circulation*, 88(3), 1166–1171.
- Lucarelli, G., Galimberti, M., Polchi, P., Angelucci, E., Baronciani, D., Giardini, C., ... Albertini, F. (1990). Bone Marrow Transplantation in Patients with Thalassemia. *New England Journal of Medicine*, 322(7), 417–421.
- Maier-Redelsperger, M., de Montalembert, M., Flahault, A., Neonato, M. G., Ducrocq, R., Masson, M.-P., ... French Study Group on Sickle Cell Disease, the. (1998). Fetal Hemoglobin and F-Cell Responses to Long-Term Hydroxyurea Treatment in Young Sickle Cell Patients. *Blood*, 91(12), 4472–4479.
- Makhro, A., Kaestner, L., & Bogdanova, A. (2017). NMDA Receptor Activity in Circulating Red Blood Cells: Methods of Detection. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1677, pp. 265–282).
- McGann, P. T., & Hoppe, C. (2017). The pressing need for point-of-care diagnostics for sickle cell disease: A review of current and future technologies. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 67, 104–113.
- McGoron, A. J., Joiner, C. H., Palascak, M. B., Claussen, W. J., & Franco, R. S. (2000). Dehydration of mature and immature sickle red blood cells during fast oxygenation/deoxygenation cycles: Role of KCl cotransport and extracellular calcium. *Blood*, 95(6), 2164–2168.
- Menzel, S., Garner, C., Gut, I., Matsuda, F., Yamaguchi, M., Heath, S., ... Thein, S. L. (2007). A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nature Genetics*, 39(10), 1197–1199.
- Messmann, R., Gannon, S., Sarnaik, S., & Johnson, R. M. (1990). Mechanical properties of sickle cell membranes. *Blood*, 75(8), 1711–1717.

- Miller, S. T., Sleeper, L. A., Pegelow, C. H., Enos, L. E., Wang, W. C., Weiner, S. J., ... Kinney, T. R. (2000). Prediction of Adverse Outcomes in Children with Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, *342*(2), 83–89.
- Minniti, C. P., Eckman, J., Sebastiani, P., Steinberg, M. H., & Ballas, S. K. (2010). Leg ulcers in sickle cell disease. In *American Journal of Hematology* (Vol. 85, pp. 831–833).
- Mohandas, N., Evans, E., Kukan, B., & Leung, A. (1985). Sickle erythrocyte adherence to vascular endothelium. Morphology correlates and the requirement for divalent cations and collagen-binding plasma proteins. *Journal of Clinical Investigation*, *76*(4), 1605–1612.
- Mohandas, Narla, & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: Past, present, and future. *Blood*, *112*(10), 3939–3948. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>
- Monfort, J.-B., & Senet, P. (2020). Leg Ulcers in Sickle-Cell Disease: Treatment Update. *Advances in Wound Care*, *9*(6), 348–356.
- Montes, R. A. O., Eckman, J. R., Hsu, L. L., & Wick, T. M. (2002). Sickle erythrocyte adherence to endothelium at low shear: role of shear stress in propagation of vaso-occlusion. *American Journal of Hematology*, *70*(3), 216–227.
- Mousa, S. A., Momen, A. Al, Sayegh, F. Al, Jaouni, S. Al, Nasrullah, Z., Saeed, H. Al, ... Qari, M. (2010). Review: Management of painful vaso-occlusive crisis of sickle-cell anemia: Consensus opinion. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, *16*(4):365–376
- Nader, E., Romana, M., & Connes, P. (2020). The Red Blood Cell—Inflammation Vicious Circle in Sickle Cell Disease. *Frontiers in Immunology*, *11*:454.
- Nader, E., Skinner, S., Romana, M., Fort, R., Lemonne, N., Guillot, N., ... Connes, P. (2019). Blood rheology: Key parameters, impact on blood flow, role in sickle cell disease and effects of exercise. *Frontiers in Physiology*, *10*:1329.
- Nagel, R. L., Fabry, M. E., Pagnier, J., Zohoun, I., Wajcman, H., Baudin, V., & Labie, D. (1985). Hematologically and Genetically Distinct Forms of Sickle Cell Anemia in Africa: The Senegal Type and the Benin Type. *New England Journal of Medicine*, *312*(14), 880–884.

- Naseer, Z. A., Bachabi, M., Jones, L. C., Sterling, R. S., & Khanuja, H. S. (2016). Osteonecrosis in sickle cell disease. *Southern Medical Journal*, 109(9):525–30
- Nath, K. A., & Hebbel, R. P. (2015). Sickle cell disease: Renal manifestations and mechanisms. *Nature Reviews Nephrology*, 11(3), 161–171.
- Ndiaye, M., Niang, S. O., Diop, A., Diallo, M., Diaz, K., Ly, F., ... Kane, A. (2016). Ulcères de jambe au cours de la drépanocytose: étude rétrospective de 40 cas. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 143(2), 103–107.
- Nguyen-Khoa, T., Mine, L., Allaf, B., Ribeil, J. A., Remus, C., Stanislas, A., ... Cavazzana, M. (2018). Sickle SCANTM (BioMedomics) fulfills analytical conditions for neonatal screening of sickle cell disease. *Annales de Biologie Clinique*, 76(4), 416–420.
- Nienhuis, A. W. (2008). Development of gene therapy for blood disorders. *Blood*, 111(9), 4431–4444.
- Noubouossie, D., Key, N. S., & Ataga, K. I. (2016). Coagulation abnormalities of sickle cell disease: Relationship with clinical outcomes and the effect of disease modifying therapies. *Blood Reviews*, 30(4):245–56
- Novelli, E. M., Little-Ihrig, L., Jorgensen, D. R., Shaaban, C. E., Isenberg, J. S., Butters, M. A., & Rosano, C. (2015). Elevated Plasma Thrombospondin-1 (TSP1) Levels Are Correlated with Oxidative Stress and Worse Cognitive Function in Sickle Cell Disease. *Blood*, 126(23), 2184–2184.
- Odièvre, M.-H., Bony, V., Benkerrou, M., Lapoumériou, C., Alberti, C., Ducrocq, R., ... Cartron, J.-P. (2008). Modulation of erythroid adhesion receptor expression by hydroxyurea in children with sickle cell disease. *Haematologica*, 93(4), 502–510.
- Ohene-Frempong, K., Oduro, J., Tetteh, H., & Nkrumah, F. (2008). SCREENING NEWBORNS FOR SICKLE CELL DISEASE IN GHANA: TABLE 1. *Pediatrics*, 121(Supplement 2), S120.2-S121.
- Ohene-Frempong, K., Weiner, S. J., Sleeper, L. A., Miller, S. T., Embury, S., Moohr, J. W., ... Gill, F. M. (1998). Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: Rates and risk factors. *Blood*, 91(1), 288–294.
- Okoko, A. R., Odzébé, A. S. W., Moyen, E., Ekouya Bowassa, G., Oko, A. P. G., Mbika-Cardorelle, A., ... Moyen, G. M. (2014). Priapism in children and adolescents

- homozygous sickle cell disease in Brazzaville. *Progres En Urologie*, 24(1), 57–61.
- Orkin, S. H., Kazazian, H. H., Antonarakis, S. E., Goff, S. C., Boehm, C. D., Sexton, J. P., ... Giardina, P. J. V. (1982). Linkage of β -thalassaemia mutations and β -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human β -globin gene cluster. *Nature*, 296(5858), 627–631.
- Pauling, L., Itano, H. A., Singer, S. J., & Wells, I. C. (1949). Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science*, 110(2865), 543–548.
- Perutz, M. F., Rossmann, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G., & North, A. C. T. (1960). Structure of Hæmoglobin: A three-dimensional fourier synthesis at 5.5- \AA resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*, 185(4711):416-22.
- Piccin, A., Murphy, W. G., & Smith, O. P. (2007). Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Reviews*, 21(3), 157–171.
- Piel, F. B., Hay, S. I., Gupta, S., Weatherall, D. J., & Williams, T. N. (2013). Global Burden of Sickle Cell Anaemia in Children under Five, 2010-2050: Modelling Based on Demographics, Excess Mortality, and Interventions. *PLoS Medicine*, 10(7), e1001484.
- Piel, F. B., Steinberg, M. H., & Rees, D. C. (2017). Sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, 376:1561–1573
- Platt, O. S. (1995). Sickle cell paths converge on hydroxyurea. *Nature Medicine*, 1(4), 307–308.
- Platt, O. S., Brambilla, D. J., Rosse, W. F., Milner, P. F., Castro, O., Steinberg, M. H., & Klug, P. P. (1994). Mortality in sickle cell disease — life expectancy and risk factors for early death. *New England Journal of Medicine*, 330(23), 1639–1644.
- Quinn, C. T. (2013). Sickle cell disease in childhood. from newborn screening through transition to adult medical care. *Pediatric Clinics of North America*, 60(6): 1363–1381.
- Quinn, C. T. (2016). Minireview: Clinical severity in sickle cell disease: the challenges of definition and prognostication. *Experimental Biology and Medicine*, 241(7), 679–688.
- Rahimy, M. C., Gangbo, A., Ahouignan, G., & Alihonou, E. (2009). Newborn screening for sickle cell disease in the Republic of Benin. *Journal of Clinical Pathology*, 62(1), 46–48.

- Ranque, B., Menet, A., Diop, I. B., Thiam, M. M., Diallo, D., Diop, S., ... Jouven, X. (2014). Early renal damage in patients with sickle cell disease in sub-Saharan Africa: A multinational, prospective, cross-sectional study. *The Lancet Haematology*, 1(2), e64–e73.
- Ribeil, J. A., Hacein-Bey-Abina, S., Payen, E., Magnani, A., Semeraro, M., Magrin, E., ... Cavazzana, M. (2017). Gene therapy in a patient with sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, 376(9), 848–855.
- Rubartelli, A., Lotze, M. T., Latz, E., & Manfredi, A. (2013). Mechanisms of sterile inflammation. *Frontiers in Immunology*, 4: 398.
- Rybicki, A. C., & Benjamin, L. J. (1998). Increased levels of endothelin-1 in plasma of sickle cell anemia patients. *Blood*, 92(7):2594–6
- Sankaran, V. G., Xu, J., Ragozy, T., Ippolito, G. C., Walkley, C. R., Maika, S. D., ... Orkin, S. H. (2009). Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11A. *Nature*, 460(7259), 1093–1097.
- Segbena, A. Y., Guindo, A., Buono, R., Kueviakoe, I., Diallo, D. A., Guernec, G., ... Leroy, V. (2018). Diagnostic accuracy in field conditions of the sickle SCAN® rapid test for sickle cell disease among children and adults in two West African settings: The DREPATEST study. *BMC Hematology*, 18: 26.
- Serjeant, G. R., Grandison, Y., Lowrie, Y., Mason, K., Phillips, J., Serjeant, B. E., & Vaidya, S. (1981). The Development of Haematological Changes in Homozygous Sickle Cell Disease: a Cohort Study from Birth to 6 Years. *British Journal of Haematology*, 48(4), 533–543.
- Sicard, D., Lieurzou, Y., Lapoumeroulie, C., & Labie, D. (1979). High genetic polymorphism of hemoglobin disorders in Laos - Complex phenotypes due to associated thalassaemic syndromes. *Human Genetics*, 50(3), 327–336.
- Silva-Pinto, A., Alencar de Queiroz, M., Antoniazco Zamaro, P., Arruda, M., & Pimentel dos Santos, H. (2019). The Neonatal Screening Program in Brazil, Focus on Sickle Cell Disease (SCD). *International Journal of Neonatal Screening*, 5(1), 11.
- Sobota, A., Sabharwal, V., Fonebi, G., & Steinberg, M. (2015). How we prevent and manage infection in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, 170, 757–767

- Solovey, A., Lin, Y., Browne, P., Choong, S., Wayner, E., & Hebbel, R. P. (1997). Circulating Activated Endothelial Cells in Sickle Cell Anemia. *New England Journal of Medicine*, 337(22), 1584–1590.
- Stakos, D. A., Kambas, K., Konstantinidis, T., Mitroulis, I., Apostolidou, E., Arelaki, S., ... Ritis, K. (2015). Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction. *European Heart Journal*, 36(22), 1405–1414.
- Steinberg, M. H. (2009, January 18). Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *TheScientificWorldJournal*, 9:46-67
- Steinberg, M. H., McCarthy, W. F., Castro, O., Ballas, S. K., Armstrong, F. D., Smith, W., ... Gardner, D. (2010). The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: A 17.5 year follow-up. *American Journal of Hematology*, 85(6), 403–408.
- Steinberg, M. H., & Sebastiani, P. (2012, August). Genetic modifiers of sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, 87(8): 795–803
- Stocker, J. W., De Franceschi, L., McNaughton-Smith, G. A., Corrocher, R., Beuzard, Y., & Brugnara, C. (2003). ICA-17043, a novel Gardos channel blocker, prevents sickled red blood cell dehydration in vitro and in vivo in SAD mice. *Blood*, 101(6), 2412–2418.
- Stuart, M. J., & Nagel, R. L. (2004). Sickle-cell disease. In *Lancet* (Vol. 364, pp. 1343–1360).
- Sundd, P., Gladwin, M. T., & Novelli, E. M. (2019). Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 14:263–292
- Swerlick, R. A., Eckman, J. R., Kumar, A., Jeitler, M., & Wick, T. M. (1993). $\alpha 4\beta 1$ -Integrin expression on sickle reticulocytes: Vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium. *Blood*, 82(6), 1891–1899.
- Telen, M. J. (2007). Role of adhesion molecules and vascular endothelium in the pathogenesis of sickle cell disease. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. 84-90
- Telen, M. J. (2016). Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease. *Blood*, 127(7):810–9

- Thein, S. L. (2018). Molecular basis of β thalassemia and potential therapeutic targets. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 70:54–65
- Therrell, B. L., Lloyd-Puryear, M. A., Ohene-Frempong, K., Ware, R. E., Padilla, C. D., Ambrose, E. E., ... Watson, M. S. (2020). Empowering newborn screening programs in African countries through establishment of an international collaborative effort. *Journal of Community Genetics*, 11(3), 253–268.
- Torres, L. de S., Okumura, J. V., Silva, D. G. H. da, & Bonini-Domingos, C. R. (2015). Hemoglobin D-Punjab: Origin, distribution and laboratory diagnosis. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 37(2):120–6.
- TOSTESON, D. C., SHEA, E., & DARLING, R. C. (1952). Potassium and sodium of red blood cells in sickle cell anemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 31(4), 406–411.
- Uda, M., Galanello, R., Sanna, S., Lettre, G., Sankaran, V. G., Chen, W., ... Cao, A. (2008). Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of β -thalassemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5), 1620–1625.
- Vichinsky, E. P., Neumayr, L. D., Earles, A. N., Williams, R., Lennette, E. T., Dean, D., ... Ware, R. (2000). Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, 342(25), 1855–1865.
- Villagra, J., Shiva, S., Hunter, L. A., Machado, R. F., Gladwin, M. T., & Kato, G. J. (2007). Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood*, 110(6), 2166–2172.
- von Brühl, M. L., Stark, K., Steinhart, A., Chandraratne, S., Konrad, I., Lorenz, M., ... Massberg, S. (2012). Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 209(4), 819–835.
- Votano, J. R., & Rich, A. (1985). Inhibition of Deoxyhemoglobin S Polymerization by Biaromatic Peptides Found To Associate with the Hemoglobin Molecule at a Preferred Site. *Biochemistry*, 24(8), 1966–1970.
- Ware, R. E., de Montalembert, M., Tshilolo, L., & Abboud, M. R. (2017). Sickle cell disease.

- In *The Lancet* (Vol. 390, Issue 10091, pp. 311–323).
- Weatherall, M. W., Higgs, D. R., Weiss, H., Weatherall, D. J., & Serjeant, G. R. (2005). Phenotype/genotype relationships in sickle cell disease: A pilot twin study. *Clinical and Laboratory Haematology*, 27(6), 384–390.
- Westerman, M., Pizzey, A., Hirschman, J., Cerino, M., Weil-Weiner, Y., Ramotar, P., ... Porter, J. (2008). Microvesicles in haemoglobinopathies offer insights into mechanisms of hypercoagulability, haemolysis and the effects of therapy. *British Journal of Haematology*, 142(1), 126–135.
- Westwick, J., Watson-Williams, E. J., Krishnamurthi, S., Marks, G., Ellis, V., Scully, M. F., ... Kakkar, V. V. (1983). Platelet activation during steady state sickle cell disease. *Journal of Medicine*, 14(1), 17–36.
- Wood, K. C., Gladwin, M. T., & Straub, A. C. (2020). Sickle cell disease: At the crossroads of pulmonary hypertension and diastolic heart failure. *Heart*, 106(8):562–568
- Wun, T., Paglieroni, T., Rangaswami, A., Franklin, P. H., Welborn, J., Cheung, A., & Tablin, F. (1998). Platelet activation in patients with sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, 100(4), 741–749.
- Xu, J., Sankaran, V. G., Ni, M., Menne, T. F., Puram, R. V., Kim, W., & Orkin, S. H. (2010). Transcriptional silencing of γ -globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. *Genes and Development*, 24(8), 783–789.
- Zhang, D., Chen, G., Manwani, D., Mortha, A., Xu, C., Faith, J. J., ... Frenette, P. S. (2015). Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature*, 525(7570), 528–532.
- Zimmerman, S. A., O’Branski, E. E., Rosse, W. F., & Ware, R. E. (1999). Hemoglobin S/O(ARAB): Thirteen new cases and review of the literature. *American Journal of Hematology*, 60(4), 279–284.