



**HAL**  
open science

**(Mal)adaptation à la vie permanente en haute altitude :  
éléments épidémiologiques, physiopathologiques et  
thérapeutiques issus de la ville la plus haute du monde (La  
Rinconada, 5100-5300 m, Pérou)**

Benoît Champigneulle

► **To cite this version:**

Benoît Champigneulle. (Mal)adaptation à la vie permanente en haute altitude : éléments épidémiologiques, physiopathologiques et thérapeutiques issus de la ville la plus haute du monde (La Rinconada, 5100-5300 m, Pérou). Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. ⟨NNT : 2023GRALS024⟩. ⟨tel-04371725⟩

**HAL Id: tel-04371725**

**<https://theses.hal.science/tel-04371725v1>**

Submitted on 4 Jan 2024

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.



HAL Authorization

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

École doctorale : ISCE - Ingénierie pour la Santé la Cognition et l'Environnement

Spécialité : MBS - Modèles, méthodes et algorithmes en biologie, santé et environnement

Unité de recherche : Hypoxie et Physiopathologie

**(Mal)adaptation à la vie permanente en haute altitude : éléments épidémiologiques, physiopathologiques et thérapeutiques issus de la ville la plus haute du monde (La Rinconada, 5100-5300 m, Pérou)**

**(Mal)adaptation to permanent life at high altitude: epidemiologic, physiopathological and therapeutic insights from the highest city in the world (La Rinconada, 5,100-5,300 m, Peru)**

Présentée par :

**Benoit CHAMPIGNEULLE**

Direction de thèse :

**Samuel VERGES**

Directeur de recherche, INSERM Délégation Auvergne-Rhône-Alpes

Directeur de thèse

**Pierre BOUZAT**

Professeur des Univ. - Praticien hosp., Université Grenoble Alpes

Co-directeur de thèse

**Julien BRUGNIAUX**

Maître de conférences HDR, Université Grenoble Alpes

Co-directeur de thèse

Rapporteurs :

**ANNE-CLAIRE LUKASZEWICZ**

Professeur des Univ. - Praticien hosp., UNIVERSITE LYON 1 - CLAUDE BERNARD

Thèse soutenue publiquement le **3 juillet 2023**, devant le jury composé de :

**SAMUEL VERGES**

Directeur de recherche, INSERM DELEGATION AUVERGNE-RHONE-ALPES

Directeur de thèse

**ANNE-CLAIRE LUKASZEWICZ**

Professeur des Univ. - Praticien hosp., UNIVERSITE LYON 1 - CLAUDE BERNARD

Rapporteuse

**PIERRE BOUZAT**

Professeur des Univ. - Praticien hosp., UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Co-directeur de thèse

**PIERRE ALBALADEJO**

Professeur des Univ. - Praticien hosp., UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Président

**RUDDY RICHARD**

Professeur des Univ. - Praticien hosp., UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

Examineur

**FRANÇOIS GIRODON**

Professeur des Univ. - Praticien hosp., UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Examineur





## Résumé

Plus de 80 millions de personnes, vivant de manière permanente en haute altitude (HA, au-dessus de 2500 m), sont chroniquement exposés à une hypoxie hypobare. La plupart de ces habitants permanents de HA en sont originaires et bénéficient d'adaptations génétiques leur permettant de faire face à leur environnement hypoxique. Parmi celles-ci, une augmentation de la concentration d'hémoglobine ([Hb]), particulièrement marquée chez les Andéens, permet une augmentation de la capacité de transport de l'oxygène mais semble en retour favoriser le développement du mal chronique des montagnes (*chronic mountain sickness*, CMS), un syndrome de maladaptation à la vie en HA, dont la prévalence est estimée autour de 10-15% dans les Andes. Typiquement, le CMS associe la présence d'une érythrocytose excessive (EE) et des signes et symptômes cliniques. La prévalence de l'EE (définie comme une [Hb]  $\geq 21$  g·dL<sup>-1</sup> chez l'homme et  $\geq 19$  g·dL<sup>-1</sup> chez la femme) et du CMS augmente avec l'âge mais il reste incertain de savoir s'il s'agit du vieillissement en soi, ou de la durée de résidence en HA, qui favorisent ces conditions. De plus, certaines conséquences potentielles de l'EE ont été peu étudiées, tel que l'impact de l'EE sur l'homéostasie du fer ou la coagulation. Par ailleurs, les essais thérapeutiques concernant le traitement du CMS sont rares, même si l'acétazolamide (ACZ) a déjà été montré comme un médicament prometteur pour réduire à la fois l'hématocrite (Hct) et les symptômes du CMS, bien que ses mécanismes d'action sous-jacents restent insuffisamment étudiés. Ainsi, l'objectif de cette thèse, à travers différentes études menées sur le terrain à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou), une ville aurifère située au Pérou et considérée comme la ville la plus haute du monde, était d'étudier plusieurs aspects épidémiologiques, physiologiques et thérapeutiques de l'EE et du CMS.

Dans la première partie de ce travail (étude 1), nous avons observé dans une étude épidémiologique longitudinale que l'Hct et les symptômes du CMS augmentaient progressivement avec les années de résidence à La Rinconada, indépendamment de l'âge à l'inclusion, entraînant une augmentation progressive de l'incidence cumulée de l'EE et du CMS au fil des années, la première précédant la seconde de quelques années. Dans la seconde partie de ce travail (étude 2), nous avons évalué l'homéostasie du fer chez les habitants de HA. Nous avons établi que le statut martial n'était pas altéré chez les Andéens vivant en HA, malgré une érythropoïèse intense. Nous avons retrouvé, chez les habitants de HA en bonne santé ou atteints

d'un CMS léger, un équilibre de l'axe ERFE-hepcidine similaire à celui observé chez les contrôles vivant en plaine. À l'inverse, les CMS les plus sévères présentaient un stress érythropoïétique plus élevé, associé à une augmentation de l'ERFE et une diminution de l'hepcidine. Dans la troisième partie de ce travail (étude 3), nous avons effectué une exploration de la coagulation chez les habitants de HA, incluant une évaluation de la coagulation sur sang total par thromboélastométrie (ROTEM®). Contrairement à ce qui avait été suggéré précédemment, nous avons observé que l'EE n'était pas associée à un état hypercoagulable et était même associée à un profil ROTEM hypocoagulable. Enfin, dans la dernière partie de ce travail (étude 4), nous avons démontré dans un essai en double aveugle, randomisé contre placebo, que l'ACZ était efficace, même à plus de 5000 m, pour améliorer l'oxygénation et réduire l'Hct chez les patients CMS après une période de traitement de trois semaines.

Prises collectivement, les différentes études constituant cette thèse, menées à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou) dans le cadre du projet de recherche Expédition 5300, contribuent à mieux comprendre les conséquences physiologiques de l'EE et du CMS, qui représentent une maladaptation à l'exposition hypoxique chronique chez les habitants de HA.

## Abstract

More than 80 million highlanders, permanently living in high-altitude (HA) areas worldwide (i.e., above 2500 m) are chronically exposed to hypobaric hypoxia. Most of them are natives from HA and benefit from genetic adaptations, allowing them to cope with their hypoxic environment. Among them, high levels of hemoglobin concentration ([Hb]), especially in Andeans, allow an increased oxygen carrying capacity but seem in turn to promote the development of chronic mountain sickness (CMS), a maladaptive syndrome whose prevalence has been previously estimated around 10-15% in the Andes. CMS typically includes excessive erythrocytosis (EE) and associated clinical signs and symptoms. The prevalence of EE (defined as  $[Hb] \geq 21 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$  in men and  $\geq 19 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$  in women) and CMS typically increases with age but it remains unclear whether ageing per se or the duration of HA residency promote these conditions. Additionally, some potential physiological consequences induced by EE remained poorly investigated such as iron homeostasis or coagulation pattern. Furthermore, therapeutic trials regarding CMS treatment are sorely missing, even if acetazolamide (ACZ) has been previously shown as a potential promising drug in order to reduce both hematocrit (Hct) and symptoms in CMS patients, albeit the underlying mechanisms of action remain insufficiently investigated. Thus, the aim of this PhD thesis, through different studies conducted in the field in La Rinconada (5100-5300 m, Peru), a gold-mining city located in southern Peru and considered as the highest city in the world, was to investigate several epidemiologic, physiological and therapeutic aspects related to EE and CMS.

In the first part of this work (study 1), by conducting the first longitudinal epidemiologic study among highlanders aiming to assess the evolution of Hct and the development of CMS symptoms over time of residency above 5000 m, we showed that Hct and clinical symptoms progressively worsened over the years spent at HA, independently of the age of inclusion, leading to a progressive increase of the cumulative incidence of both EE and CMS over the years, the first one preceding the second with a few years difference. In the second part of this work (study 2), we assessed for the first time the iron homeostasis in both healthy and CMS highlanders ; we showed that iron status was not altered in Andean highlanders, despite a stronger erythropoietic drive leading to a massive hemoglobin mass increase. Despite this increased iron consumption, we showed that in healthy and mild CMS highlanders, a similar

ERFE-hepcidin equilibrium than in control lowlanders was reached. Conversely, the most severe CMS highlanders exhibited a higher erythropoietic stress, leading to an increased ERFE and a blunted hepcidin levels. In the third part of this work (study 3), we performed an exhaustive evaluation of the coagulation system in both healthy and EE highlanders, including a whole-blood coagulation assay using thromboelastometry (ROTEM®) performed in the field. As opposed to what was previously suggested, we observed that EE was not associated with a hypercoagulable state, and was even associated with a hypocoagulable ROTEM profile, for which the clinical significances remain to be clarified. At last, in the last part of this work (study 4), we demonstrated in a double-blinded randomized controlled trial against placebo that ACZ was effective to significantly improve oxygenation and reduce Hct in CMS patients after a short-treatment period of three weeks, even in such an important hypoxic environment as above 5000 m.

Altogether, the different studies included in this PhD thesis and conducted in La Rinconada (5100-5300 m, Peru) as part of the Expedition 5300 research project, contribute to a better understanding of the physiological consequences of EE and CMS which represent a maladaptation to chronic hypoxic exposure in highlanders.

## **Remerciements**

### **Au Docteur Samuel Vergès,**

Merci de m'avoir accueilli et intégré dans ce passionnant projet de recherche en haute altitude. Merci pour ta confiance et ton encadrement constant et rigoureux tout au long de cette thèse, aussi bien à La Rinconada qu'à Grenoble.

### **Au Professeur Pierre Bouzat,**

Merci pour ta confiance, ton encadrement, ainsi que ton accueil au sein du Pôle Anesthésie-Réanimation.

### **Au Docteur Julien Brugniaux,**

Merci pour ton accompagnement dans ces projets de recherche au sein d'Expédition 5300 et pour ton encadrement dans ce travail de thèse.

### **Aux Professeurs Anne-Claire Lukaszewicz et Damian Bailey,**

Merci de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de cette thèse et d'avoir ainsi pris le temps d'évaluer et de porter un regard critique sur ce travail.

### **Aux Professeurs Pierre Albaladejo, Ruddy Richard et François Girodon,**

Merci de m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury de thèse et d'avoir pris le temps d'examiner ce travail, malgré vos occupations et contraintes professionnelles respectives.

**À toute l'équipe du projet de recherche Expédition 5300, et en particulier aux Docteurs Stéphane Doutreleau, Emeric Stauffer, Paul Robach, Ivan Hanco, aux Professeurs Aurélien Pichon et Philippe Connes, à Blandine Deschamps et à Axel Pittet,** pour leur expertise, leur collaboration, leur bonne humeur et leur motivation constante à La Rinconada, ainsi que leur aide précieuse dans la conduite de ces travaux de recherche. Les travaux présentés dans cette thèse sont l'aboutissement de ce travail d'équipe et de cet effort collectif !

## Remerciements

Aux nombreuses personnes avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer et d'échanger ces dernières années, au cours de ces recherches menées en altitude, et tout particulièrement aux Docteurs Michael Furian, Sébastien Baillieul, Karen Davranche, Sébastien Bailly, Dorra Guergour, François Caton, Landry Seyve, Raphaël Marlu et au Professeur Philip Ainslie : merci pour votre collaboration et votre aide précieuse dans la conduite de ces projets. Aux Professeurs Silvia Ulrich, Konrad Bloch et Talant Sooronbaev, pour m'avoir permis de participer à la Swiss-Kyrgyz High-Altitude Medicine and Research Initiative.

Aux Docteurs Mathieu Marillier et Stéphane Doutreleau, merci pour votre accompagnement quotidien, votre rigueur, votre intégrité scientifique et votre amitié (ainsi que pour toutes ces dosettes de café). À toute l'équipe médicale et paramédicale (sans oublier les internes et les secrétaires) du service de Médecine du Sport de l'hôpital Sud ainsi qu'aux doctorants et aux chercheurs titulaires de l'équipe Exercice-Hypoxie pour leur accueil bienveillant et amical.

Aux collègues de la Réanimation de Bastia et des Soins Intensifs de Voiron, pour leur accueil régulier pendant ces quelques remplacements durant ces années de thèse.

Au Professeur Jean-François Payen, pour sa confiance et son accueil au sein de son service, ainsi qu'à mes nouveaux collègues du Pôle Anesthésie-Réanimation du CHUGA, et particulièrement à ceux de la réanimation neurochirurgicale, pour leur accueil bienveillant.

À mes anciens collègues parisiens (et néanmoins amis !), et tout particulièrement à Florence Bellenfant, Gersende Favé, Arthur Neuschwander, Baptiste Duceau, Pierre Garçon et Émilie Ragot, pour m'avoir laissé quelques bons souvenirs de la vie parisienne.

À ma famille, et tout particulièrement à mes parents, pour leur soutien constant (et la relecture attentive de ce travail).

À Marine et Guillaume : c'est un vrai plaisir non prévu de vous retrouver à Grenoble ! Merci d'être là ! À Benco, pour toutes ces années d'amitié depuis les bancs des Saints-Pères !

Aux Catoviens et apparentés, et en particulier à Marie-France et Julien, pour leur amitié de toujours, malgré la (petite) distance qui maintenant nous sépare.

Aux Grenoblois : à Presles, à Chamonix, dans les Écrins ou dans la cuvette, à vélo, à ski, en chaussons ou en crampons, un piolet, un n°3 ou une bière à la main, merci pour tous ces bons moments passés ensemble au bistrot, mais surtout encordés en montagne !

# Sommaire

<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>10</b>
<b>Table des illustrations.....</b>	<b>12</b>
<b>Figures .....</b>	<b>12</b>
<b>Tables.....</b>	<b>12</b>
<b>1 Introduction.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Contraintes environnementales liées à la haute altitude .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Zones d'altitude.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Acclimatation ou adaptation ? .....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Mécanismes d'acclimatation lors d'une exposition aiguë en haute altitude.....</b>	<b>17</b>
1.4.1 Une réponse ventilatoire et cardio-vasculaire rapide.....	19
1.4.2 La réponse hématologique et rénale à l'hypoxie .....	22
1.4.3 Métabolisme du fer lors d'une exposition aiguë en altitude .....	24
1.4.4 Pathologies spécifiques liées à l'altitude .....	26
1.4.4.1 Mal aigu des montagnes.....	26
1.4.4.2 Œdème cérébral de haute altitude .....	28
1.4.4.3 Œdème pulmonaire de haute altitude.....	29
<b>1.5 Mécanismes d'adaptation lors de la vie permanente en haute altitude .....</b>	<b>30</b>
1.5.1 Des populations et des phénotypes .....	31
1.5.2 Adaptation hématologique.....	32
1.5.3 Adaptation ventilatoire .....	35
1.5.4 Adaptation cardiaque et circulatoire .....	35
1.5.5 Adaptation musculaire et métabolique.....	36
1.5.6 Gènes impliqués dans l'adaptation à la vie en haute altitude .....	37
<b>1.6 La maladaptation à la vie permanente en haute altitude : le mal chronique des montagnes (<i>chronic mountain sickness</i>).....</b>	<b>37</b>
1.6.1 Éléments historiques .....	37
1.6.2 Aspects diagnostiques.....	38
1.6.3 Physiopathologie.....	41
1.6.4 Prévalence et facteurs associés au CMS .....	44
1.6.5 Impact de l'EE et du CMS sur l'organisme et morbi-mortalité.....	45

1.6.5.1	Impact hématologique, martial et sur les volumes intravasculaires.....	45
1.6.5.2	Impact sur le système cardio-vasculaire .....	48
1.6.5.3	Impact sur le système respiratoire.....	51
1.6.5.4	Impact rénal.....	51
1.6.5.5	Impact neurocognitif .....	51
1.6.5.6	Impact sur le système hémostatique.....	52
1.6.5.7	Capacité à l'exercice .....	53
1.6.5.8	Morbi-mortalité .....	54
1.6.6	Traitement du CMS .....	54
1.6.6.1	Traitements non médicamenteux .....	55
1.6.6.1.1	Phlébotomie .....	55
1.6.6.1.2	Exercice physique .....	56
1.6.6.2	Traitements médicamenteux .....	56
1.6.6.2.1	L'aire pré-acétazolamide .....	57
1.6.6.2.2	L'acétazolamide : un traitement promoteur.....	58
1.6.6.2.2.1	Études cliniques.....	58
1.6.6.2.2.2	Mécanismes d'action sous-jacents .....	59
1.6.6.2.3	Alternatives médicamenteuses à l'acétazolamide : pistes potentielles .....	60
1.6.7	Controverses actuelles .....	60
1.6.7.1	Anémie en haute altitude : comment la définir ? .....	60
1.6.7.2	Quel seuil pour définir l'érythrocytose excessive ? .....	61
1.6.7.3	Associations entre symptômes et concentration d'hémoglobine .....	62
1.6.7.4	EE et CMS chez la femme .....	63
<b>2</b>	<b>Objectifs et hypothèses .....</b>	<b>64</b>
<b>3</b>	<b>Étude 1 : Évolution de l'érythrocytose excessive et du mal chronique des montagnes au cours du temps de résidence en haute altitude – Une étude épidémiologique longitudinale.....</b>	<b>66</b>
3.1	Introduction .....	66
3.2	Résumé .....	67
3.3	Article publié et contribution personnelle .....	68
<b>4</b>	<b>Étude 2 : Métabolisme du fer chez les habitants de haute altitude souffrant de mal chronique des montagnes – Une étude observationnelle transversale.....</b>	<b>74</b>
4.1	Introduction .....	74
4.2	Résumé de l'étude.....	75
4.3	Article publié et contribution personnelle .....	76

<b>5</b>	<b>Étude 3 : Impact de l'érythrocytose excessive sur la coagulation chez les habitants de La Rinconada – Une étude observationnelle transversale.....</b>	<b>89</b>
5.1	Introduction .....	89
5.2	Résumé de l'étude.....	91
5.3	Manuscrit soumis et contribution personnelle .....	92
<b>6</b>	<b>Étude 4 : Effet précoce de l'acétazolamide sur la masse d'hémoglobine et le volume plasmatique chez des patients souffrant de mal chronique des montagnes – Analyse intermédiaire d'une étude randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo .....</b>	<b>120</b>
6.1	Introduction .....	120
6.2	Résumé .....	121
6.3	Article publié et contribution personnelle .....	122
<b>7</b>	<b>Perspectives de recherche.....</b>	<b>139</b>
7.1	Un besoin d'études longitudinales .....	139
7.2	Vers une redéfinition de l'EE et du CMS ? .....	139
7.3	Homéostasie du fer en haute altitude : des questions en suspens .....	141
7.4	Hémostase et EE : des études complémentaires à mener .....	143
7.5	Évaluation des thérapeutiques sur le long terme et compréhension de leurs mécanismes sous-jacents.....	144
<b>8.</b>	<b>Conclusion générale .....</b>	<b>145</b>
<b>9.</b>	<b>Références.....</b>	<b>146</b>
<b>10.</b>	<b>Annexe : autres publications produites pendant la période de thèse.....</b>	<b>167</b>

## Liste des abréviations

ACZ, acétazolamide

BV, *blood volume* (volume sanguin total)

CaO<sub>2</sub>, contenu artériel en oxygène

CMS, *chronic mountain sickness* (mal chronique des montagnes)

DC, débit cardiaque

EPO, érythropoïétine

ERFE, érythroferrone

FC, fréquence cardiaque

F<sub>I</sub>O<sub>2</sub>, fraction inspirée en oxygène

FMD, *flow-mediated vasodilatation* (vasodilatation induite par le flux)

FO<sub>2</sub>, fraction d'oxygène dans l'air

Fpn, ferroportine

HAPH, *high-altitude pulmonary hypertension* (hypertension pulmonaire de haute altitude)

[Hb], concentration sanguine en hémoglobine

Hb<sub>mass</sub>, masse totale d'hémoglobine

Hct, hématocrite

HIF, *hypoxia inducible factor* (facteur induit par l'hypoxie)

HRE, *hypoxia response element* (élément de réponse à l'hypoxie)

IEC, inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

IL-6, interleukine 6

MAM, mal aigu des montagnes

MoCA, *Montreal Cognitive Assessment*

NTBI, *non-transferrin-bound iron* (fer libre non lié à la transferrine)

O<sub>2</sub>, oxygène

OCHA, œdème cérébral de haute altitude

OLHA, œdèmes localisés de haute altitude

OMS, organisation mondiale de la santé

OPHA, œdème pulmonaire de haute altitude

PaCO<sub>2</sub>, pression partielle artérielle en dioxyde de carbone

P<sub>A</sub>O<sub>2</sub>, pression partielle alvéolaire en oxygène

PaO<sub>2</sub>, pression partielle artérielle en oxygène  
PAP<sub>m</sub>, pression artérielle pulmonaire moyenne  
PAP<sub>s</sub>, pression artérielle pulmonaire systolique  
P<sub>B</sub>, pression barométrique  
PHD, prolyl-hydroxylase  
P<sub>H<sub>2</sub>O</sub>, pression partielle en vapeur d'eau  
P<sub>i</sub>O<sub>2</sub>, pression partielle inspirée en oxygène  
PO<sub>2</sub>, pression partielle en oxygène  
PV, *plasma volume* (volume plasmatique)  
RBCV, *red blood cell volume* (volume total des globules rouges)  
RVH, réponse ventilatoire à l'hypoxie  
RVP, résistances vasculaires pulmonaires  
SaO<sub>2</sub>, saturation artérielle en oxygène de l'hémoglobine  
SENP1, *sentrin-specific protease 1*  
sEPO<sub>r</sub>, récepteurs solubles à l'EPO  
SRAA, système rénine-angiotensine-aldostérone  
sTfR, *soluble transferrin receptor* (récepteur soluble de la transferrine)  
TaO<sub>2</sub>, transport artériel en oxygène  
TfR, *transferrin receptor* (récepteur de la transferrine)  
Tsat, *transferrin saturation* (coefficient de saturation de la transferrine)  
V̇O<sub>2</sub> max, consommation maximale d'oxygène  
V̇O<sub>2</sub> pic, pic de consommation d'oxygène  
VPH, vasoconstriction pulmonaire hypoxique

# Table des illustrations

## Figures

Figure 1 : La diminution de la pression partielle en oxygène (PO <sub>2</sub> ) avec l'altitude induit une hypoxie hypobare. ....	14
Figure 2 : Classification proposée des zones d'altitude en fonction des effets physiologiques attendus chez l'homme et induits par la diminution de la pression atmosphérique. D'après Imray et coll. <sup>13</sup> et Wilson et coll. <sup>23</sup> .....	16
Figure 3 : Mécanismes des principales réponses physiologiques lors d'une exposition hypoxique aiguë en haute altitude (Panel A) et chronologie de celles-ci (Panel B). D'après Luks et coll. <sup>14,27</sup> .....	17
Figure 4 : La réponse cellulaire à l'hypoxie : schéma simplifié de la régulation de l'activité du facteur transcriptionnel induit par l'hypoxie (HIF). D'après Luks et coll. <sup>27</sup> .....	18
Figure 5 : Marqueurs du métabolisme du fer et régulation du métabolisme du fer par l'axe EPO-ERFE-hepcidine. D'après Muckenthaler et al. <sup>82</sup> .....	25
Figure 6 : Principales populations de haute altitude et durées proposées de résidence en haute altitude. D'après Tymko et coll. <sup>112</sup> .....	31
Figure 7 : Comparaison des volumes intravasculaires entre les habitants de plaine (au niveau de la mer et lors d'un séjour en haute altitude) et les habitants de haute altitude (Tibétains et Andéens). D'après Williams et coll. <sup>45</sup> .....	34
Figure 8 : Facteurs aboutissant à l'expression d'une érythrocytose excessive, représentant un phénotype maladaptif chez les résidents permanents de haute altitude soumis à une exposition hypoxique chronique. D'après Villafuerte et coll. <sup>146</sup> .....	43

## Tables

Tableau 1 : Principales caractéristiques physiologiques des habitants de haute altitude (Andéens, Tibétains et Éthiopiens) vivant entre 3500 et 4500 m. Adapté d'après Luks et coll. <sup>1</sup> .....	32
Tableau 2 : Score de Qinghai utilisé pour le diagnostic de mal chronique des montagnes ( <i>chronic mountain sickness</i> , CMS) et pour évaluer sa sévérité. D'après León-Velarde et coll. <sup>126</sup> .....	40

# 1 Introduction

## 1.1 Contraintes environnementales liées à la haute altitude

L'environnement d'altitude est caractérisé par de nombreuses modifications environnementales, hostiles à la vie humaine.<sup>1,2</sup> Parmi celles-ci, on peut notamment citer :

- une diminution de la température absolue, de l'ordre de 1°C par 150 m de dénivellation ; la température ressentie est par ailleurs potentiellement majorée par l'effet du vent (refroidissement éolien ou effet *Windchill*),
- une diminution de l'humidité de l'air,
- une majoration des rayonnements ultra-violets,
- une diminution de la densité de l'air,
- une diminution de la pression atmosphérique.

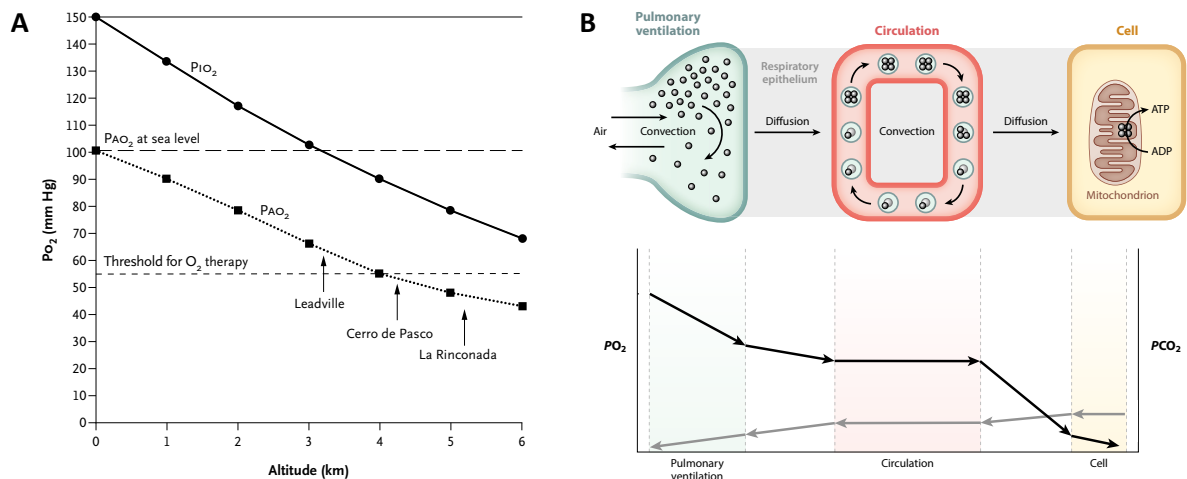
La modification environnementale la plus impactante pour la vie humaine est liée à la diminution exponentielle de la pression atmosphérique avec l'altitude.<sup>3</sup> Celle-ci n'est d'ailleurs pas uniforme à la surface du globe (à une même altitude, elle est plus marquée lorsque l'on s'éloigne de l'équateur et est maximale aux pôles) et elle varie avec les saisons (plus basse en hiver).<sup>3</sup> La diminution de la pression barométrique ( $P_B$ ) avec l'altitude va entraîner une diminution de la pression partielle en oxygène ( $PO_2$ )<sup>a</sup> et donc une diminution de la pression partielle inspirée en oxygène ( $P_{I}O_2$ )<sup>b</sup> puis de la pression partielle alvéolaire en oxygène ( $P_{A}O_2$ ), comme illustré dans la figure 1A. Cette diminution de la  $P_{A}O_2$  va ensuite se répercuter tout au long de la cascade du transport de l'oxygène (figure 1B) et aboutir, même en l'absence de limitation pathologique d'une des étapes de transport, à une hypoxie hypobare dont l'intensité va principalement dépendre de l'altitude considérée et, dans une moindre mesure, des mécanismes physiologiques d'acclimatation ou d'adaptation (que nous détaillerons par la suite), permettant de limiter cette hypoxie.

---

<sup>a</sup>  $PO_2 = FO_2 \times P_B$ , où  $FO_2$  est la fraction d'oxygène dans l'air (0,2094).<sup>1</sup>

<sup>b</sup>  $P_{I}O_2 = F_{I}O_2 \times (P_B - P_{H_2O})$  où  $F_{I}O_2$  représente la fraction inspirée en oxygène (0,2094) et  $P_{H_2O}$  représente la pression partielle en vapeur d'eau, qui est constante à 47 mmHg à 37°C, indépendamment de l'altitude.<sup>1</sup>

Ainsi, à l'extrême, des mesures de gaz expirés réalisées au sommet de l'Everest à 8848 m d'altitude chez un alpiniste retrouvaient une  $P_{A}O_2$  moyenne de 37,6 mmHg<sup>4</sup>; plus récemment, une mesure invasive artérielle par ponction fémorale réalisée à 8400 m, lors de la redescente de la voie normale népalaise chez quatre alpinistes, retrouvait une pression partielle artérielle en oxygène ( $P_{a}O_2$ ) moyenne de 24,6 mmHg.<sup>5</sup> Des mesures artérielles combinées de différentes expéditions scientifiques conduites dans les Andes et en Himalaya, entre 5000 et 5100 m d'altitude retrouvaient des  $P_{a}O_2$  (moyenne  $\pm$  écart-type) de  $44 \pm 7$  mmHg (chez des habitants de plaine acclimatés depuis 14 jours), de  $35 \pm 4$  mmHg (chez des Andéens) et de  $41 \pm 6$  mmHg (chez des Sherpas).<sup>6</sup>



**Figure 1** : La diminution de la pression partielle en oxygène ( $PO_2$ ) avec l'altitude induit une hypoxie hypobare.

**Panel A** (d'après West<sup>7</sup>) : Représentation de la diminution de la pression partielle inspirée en oxygène ( $P_{I}O_2$ ) et de la pression partielle alvéolaire en oxygène ( $P_{A}O_2$ ) avec l'altitude ; Leadville (3100 m, Colorado, USA), Cerro de Pasco (4300 m, Pérou), La Rinconada (5100-5300 m, Pérou).

**Panel B** (d'après Storz et coll.<sup>8</sup>) : Cascade de l'oxygène ( $O_2$ ). L' $O_2$  est transporté depuis l'air atmosphérique jusqu'aux mitochondries, via un cheminement comportant différentes étapes de transport, diffusives et convectives : ventilation pulmonaire, diffusion pulmonaire, circulation sanguine et enfin diffusion tissulaire. Les étapes diffusives sont entraînées par le gradient de  $PO_2$  entre chaque compartiment, conduisant à une diminution de la  $PO_2$  entre chaque étape diffusive.

## 1.2 Zones d'altitude

À ce jour, il n'existe pas de classification internationalement reconnue pour définir des zones d'altitude précises, prenant en compte les effets de la diminution de la pression atmosphérique sur l'organisme humain.<sup>9</sup> En effet, le caractère continu et progressif de cette décroissance, les variations régionales et saisonnières de la pression atmosphérique, ainsi qu'une grande variabilité dans la réponse individuelle, rendent difficile la définition de limites strictes. Néanmoins, un seuil d'altitude supérieur ou égal à 2500 m est communément utilisé dans la littérature pour définir la haute altitude.<sup>9-13</sup> Ce seuil correspond approximativement à l'altitude à laquelle un sujet vivant en plaine et non acclimaté peut commencer à ressentir les effets de la diminution de la PO<sub>2</sub> au repos, même si des effets peuvent être ressentis dès 2000 m chez des sujets sensibles,<sup>11,12</sup> voire 1500 m en cas de comorbidités.<sup>14</sup>

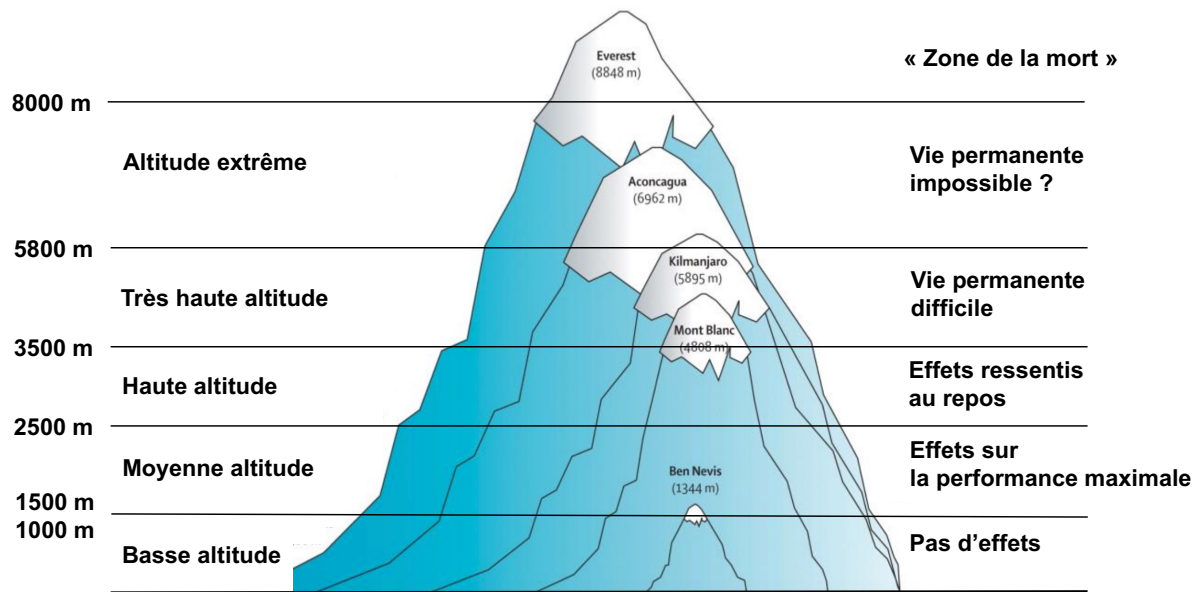
On peut alors définir de manière schématique, comme illustré dans la figure 2, différentes zones d'altitude, en fonction des effets attendus sur l'organisme humain.<sup>2,13,15</sup>

Il est à noter que des seuils légèrement différents ont également été proposés par d'autres auteurs, définissant, par exemple, la moyenne altitude entre 2000 et 3000 m et la haute altitude entre 3000 et 5500 m.<sup>16</sup>

La vie humaine permanente est considérée comme probablement impossible au-dessus d'une altitude de 5800 m,<sup>13,17</sup> même si, de manière exceptionnelle, une résidence prolongée de quelques années avait été décrite chez quatre mineurs chiliens à une altitude de 5950 m.<sup>18</sup> Ainsi, le lieu de résidence permanent le plus haut du monde, est la ville minière de La Rinconada, située au sud-est du Pérou dans la région de Puno, à une altitude centrale de 5100 m (altitude maximale : 5300 m).<sup>19</sup> En l'absence d'un recensement exact de la population locale, il est communément estimé que 50 000 à 70 000 personnes, principalement originaires du plateau andéen de l'Altiplano, vivent de manière permanente à une telle altitude, attirées par l'activité économique en lien avec les mines d'or locales.<sup>20</sup>

Le chiffre de 140 millions de personnes résidant de manière permanente à haute altitude (c'est à dire au-dessus de 2500 m d'altitude) et donc soumises à une hypoxie chronique, était jusqu'à il y a peu, habituellement avancé.<sup>7,10</sup> Cette estimation a été récemment revue à la baisse. Il est donc actuellement estimé que 81,6 millions de personnes (représentant 1,07% de la population mondiale), résident de manière permanente à une altitude supérieure ou égale à

2500 m.<sup>21</sup> Par ailleurs, de nombreux résidents de plaine, à l'occasion de voyages touristiques, d'activités sportives (trek, alpinisme) ou d'activités professionnelles, sont susceptibles d'être exposés de manière aiguë ou intermittente à la haute altitude.<sup>11,14</sup> Il est ainsi estimé qu'environ 100 millions de personnes voyagent chaque année à plus de 2500 m d'altitude.<sup>22</sup>



**Figure 2 :** Classification proposée des zones d'altitude en fonction des effets physiologiques attendus chez l'homme et induits par la diminution de la pression atmosphérique. D'après Imray et coll.<sup>13</sup> et Wilson et coll.<sup>23</sup>

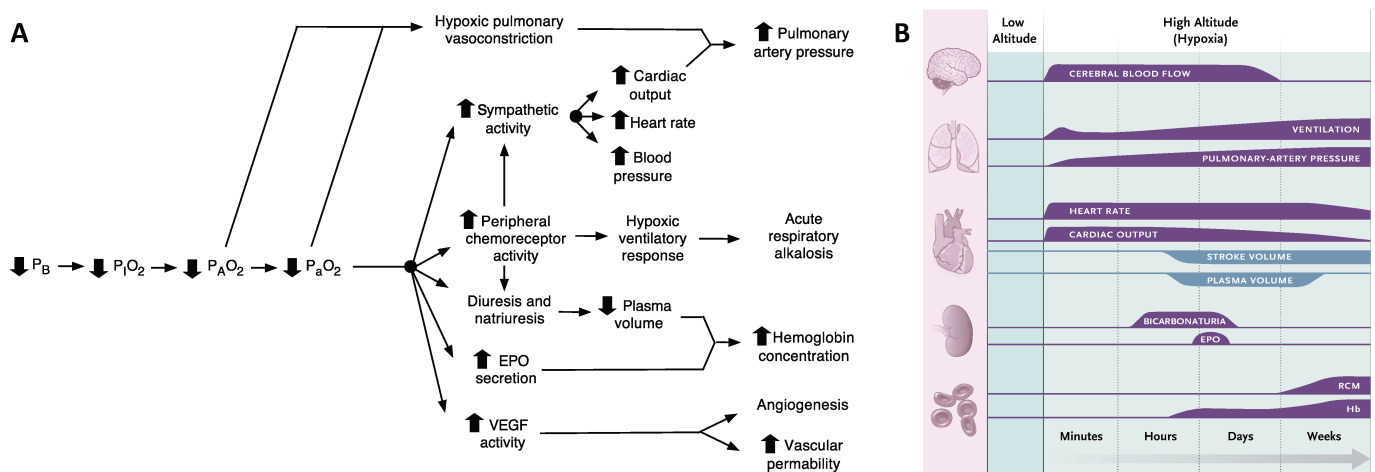
### 1.3 Acclimatation ou adaptation ?

Si les termes « acclimatation » ou « adaptation » à la haute altitude sont fréquemment, et à tort, considérés comme synonymes et interchangeables, leurs définitions et usages sont en fait différents. Ainsi, l'acclimatation à l'altitude correspond aux mécanismes physiologiques mis en jeu lors d'une exposition à l'altitude d'un individu préalablement non exposé et permettant de contrebalancer les effets de la diminution de la  $PO_2$ , dans le but d'un maintien de performance.<sup>24</sup> L'adaptation fait elle référence à « des traits phénotypiques sur lesquels la sélection naturelle a agi, à savoir, toute caractéristique de structure, de fonction, ou de comportement qui augmente la capacité de survivre et de se reproduire dans un environnement

donné ». <sup>10</sup> L'adaptation à la haute altitude correspond donc à un processus génétique évolutionnaire, résultant d'une sélection naturelle, au fil des générations, dans les populations vivant de manière permanente en haute altitude depuis plusieurs milliers d'années. <sup>10,24,25</sup>

### 1.4 Mécanismes d'acclimatation lors d'une exposition aiguë en haute altitude

Lors d'une exposition aiguë en altitude, des mécanismes physiologiques, permettant d'optimiser les apports tissulaires en oxygène, se mettent en place en réponse à la diminution de la  $P_{AO_2}$  et de la  $P_{aO_2}$  (figure 3). <sup>16,26,27</sup>

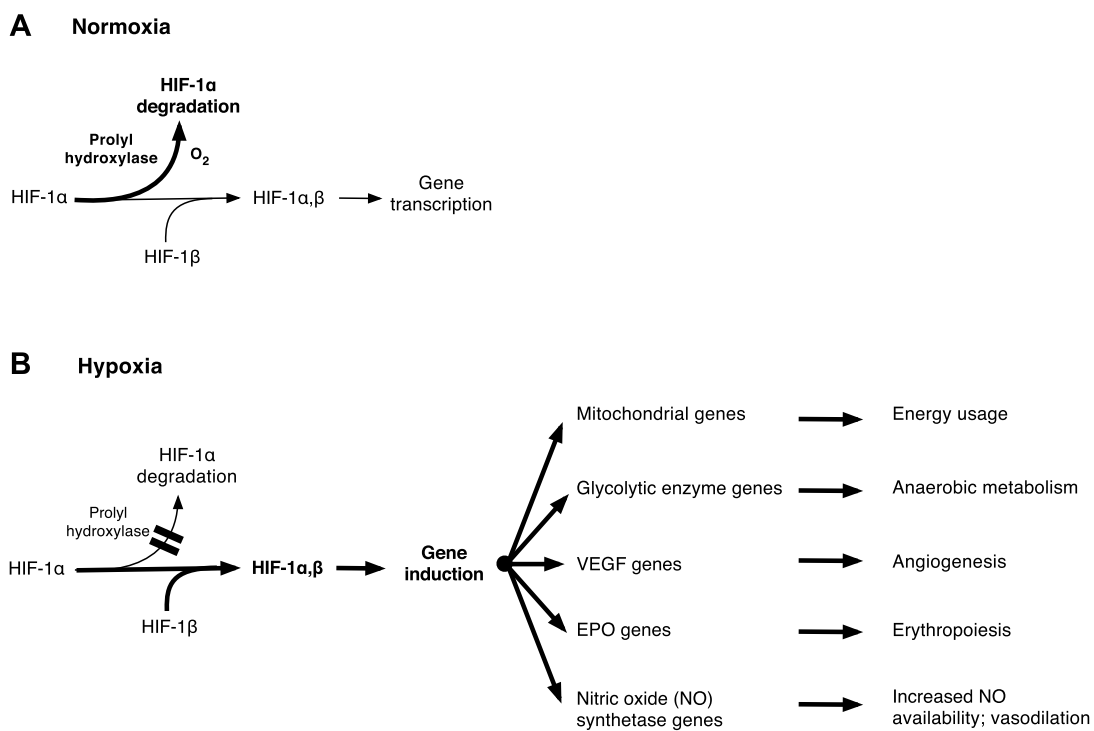


**Figure 3** : Mécanismes des principales réponses physiologiques lors d'une exposition hypoxique aiguë en haute altitude (Panel A) et chronologie de celles-ci (Panel B). D'après Luks et coll. <sup>14,27</sup>

$P_B$ , pression barométrique ;  $P_{IO_2}$ , pression partielle inspirée en oxygène ;  $P_{AO_2}$ , pression partielle alvéolaire en oxygène ;  $P_{aO_2}$ , pression partielle artérielle en oxygène ; EPO, érythropoïétine ; VEGF, *vascular endothelial growth factor* ; Hb, concentration en hémoglobine ; RCM, *red-cell mass*.

Certains de ces mécanismes, médiés par la détection de la baisse de la  $P_{aO_2}$  par les chémorécepteurs périphériques artériels, sont très rapidement mis en œuvre, dès les premières minutes d'exposition hypoxique ; à l'inverse, certains mécanismes d'acclimatation nécessitant une transcription génique sont plus longs à se mettre en place (figure 3). <sup>27</sup> Au niveau cellulaire,

la transcription des gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie (métabolisme énergétique, angiogenèse, érythropoïèse, vasomotricité...) passe par la stabilisation en hypoxie de la sous-unité cytoplasmique  $\alpha$  du facteur transcriptionnel HIF (*hypoxia inducible factor*), permettant ainsi sa liaison à la sous-unité  $\beta$  présente dans le noyau (figure 4) ; l'hétérodimère HIF ainsi constitué en condition d'hypoxie induit la transcription de nombreux gènes cibles possédant un élément de réponse HRE (*hypoxia response element*).<sup>28,29</sup> Il existe deux principales isoformes de HIF : si l'expression de HIF-1 $\alpha$  est ubiquitaire, celle de HIF-2 $\alpha$  est limitée à certains tissus et populations cellulaires. Ainsi, par exemple, l'augmentation de la sécrétion d'érythropoïétine (EPO) en hypoxie, par les fibroblastes présents dans l'interstitium du cortex rénal, est sous la dépendance spécifique de HIF-2.<sup>29</sup>



**Figure 4 : La réponse cellulaire à l'hypoxie : schéma simplifié de la régulation de l'activité du facteur transcriptionnel induit par l'hypoxie (HIF). D'après Luks et coll.<sup>27</sup>**

**Panel A :** En normoxie, la sous-unité  $\alpha$  de HIF, présente dans le cytoplasme, est hydroxylée par des prolyl-hydroxylases (PHD). Cette hydroxylation conduit à la reconnaissance de HIF- $\alpha$  par la protéine von Hippel-Lindau, à son ubiquitination, puis à sa dégradation par le protéasome (voie de dégradation non représentée sur la figure).

**Panel B :** En situation d'hypoxie, l'inactivation des PHD permet la stabilisation de HIF- $\alpha$  et son entrée dans le noyau, où elle se lie à la sous-unité  $\beta$  de HIF. L'hétérodimère HIF- $\alpha,\beta$  ainsi constitué va permettre d'induire la transcription de gènes présentant un élément de réponse à l'hypoxie (HRE) au niveau de leur séquence promotrice.

Ainsi, au bout de quelques jours à quelques semaines, ces mécanismes de réponse physiologique permettront à l'organisme d'atteindre un état d'acclimatement, c'est-à-dire de stabilité.<sup>30</sup> Malgré cet acclimatement, la consommation maximale d'oxygène ( $\dot{V}O_2 \text{ max}$ ) reste diminuée en altitude par rapport au niveau de la mer, de manière proportionnelle à l'altitude atteinte.<sup>31</sup> Par ailleurs, la prolongation d'un séjour à des altitudes supérieures à 5000-5500 m pendant plusieurs semaines est associée à une dégradation des conditions physiques.<sup>17,32</sup>

#### 1.4.1 Une réponse ventilatoire et cardio-vasculaire rapide

La réponse ventilatoire et cardio-vasculaire à l'hypoxie est rapide et survient dans les premières minutes d'exposition en haute altitude (figure 3). La détection de l'hypoxémie (*oxygen-sensing*) par les chémorécepteurs périphériques artériels (majoritairement situés au niveau des glomus carotidiens) passe principalement par l'inhibition de canaux ioniques potassiques transmembranaires sensibles à l'hypoxie, même si les mécanismes exacts de signalisation restent imparfaitement compris.<sup>33,34</sup> Le signal afférent ainsi déclenché et transmis aux centres respiratoires du tronc cérébral va entraîner une hyperventilation, responsable d'une diminution de la pression partielle artérielle en dioxyde de carbone ( $P_aCO_2$ ) et donc une alcalose respiratoire<sup>8</sup> ; cette hyperventilation va surtout permettre une augmentation de la  $P_{A}O_2$  (en accord avec l'équation des gaz alvéolaires, sans toutefois dépasser la  $P_{I}O_2$ )<sup>a</sup>, et donc une augmentation de la  $P_aO_2$ , sans toutefois permettre un retour de celle-ci à sa valeur au niveau de la mer.<sup>35,36</sup> Cette hyperventilation semble être plus le fait d'une augmentation du volume courant que d'une augmentation de la fréquence respiratoire.<sup>37</sup> L'intensité de la réponse ventilatoire à l'hypoxie (RVH) dépend bien sûr du niveau absolu d'hypoxie (ou de l'altitude considérée), mais également de la sensibilité des chémorécepteurs périphériques.<sup>16,27</sup> Il existe donc une grande variabilité interindividuelle en termes de RVH, principalement d'origine génétique.<sup>38</sup> La RVH est également susceptible d'être légèrement influencée par le vieillissement et par le cycle hormonal chez la femme.<sup>39,40</sup> L'hyperventilation est initialement modulée par l'alcalose respiratoire qui exerce un effet inhibiteur sur les chémorécepteurs centraux.<sup>41</sup> La compensation rénale progressive de l'alcalose respiratoire, associée à une augmentation de la RVH dans les premiers jours suivant l'arrivée en altitude, va entraîner une

---

<sup>a</sup> Équation des gaz alvéolaires sous sa forme simplifiée :  $P_{A}O_2 = P_{I}O_2 - P_aCO_2/R$ , où R est le quotient respiratoire, c'est-à-dire le rapport entre le volume de  $CO_2$  produit et le volume d' $O_2$  consommé dans le même temps.<sup>1</sup>

augmentation progressive de la ventilation et une amélioration progressive de la  $PaO_2$  qui restera néanmoins limitée par la  $PiO_2$ .<sup>27,41</sup> Ce phénomène, progressif sur quelques jours, correspond à l'acclimatation ventilatoire. La RVH est donc un mécanisme physiologique « clef » dans l'acclimatation à l'hypoxie en haute altitude et une moindre sensibilité de la RVH est associée à la survenue de formes sévères de pathologies spécifiques de haute altitude (cf. infra).<sup>42</sup> De manière intéressante, il a été observé une RVH plus faible chez certains alpinistes de très haut niveau en comparaison à d'autres alpinistes ou à des sportifs entraînés en plaine.<sup>43,44</sup> Il a été suggéré que cette observation, qui semblait à première vue paradoxale, était en lien avec une meilleure efficacité ventilatoire qui offrait à ces alpinistes, une réserve ventilatoire plus importante, leur permettant ainsi la réalisation d'ascensions à des altitudes extrêmes, sans supplémentation en oxygène.<sup>44</sup>

Sur le plan cardio-vasculaire, la stimulation des chémorécepteurs va entraîner une activation du système nerveux sympathique et une inhibition du système parasympathique,<sup>8,15,34</sup> responsables d'une augmentation de la fréquence cardiaque (FC) et donc du débit cardiaque (DC), le volume d'éjection systolique étant peu ou pas impacté.<sup>16,27,45</sup> À l'exercice, pour une intensité donnée, la FC à l'effort est également plus élevée en altitude qu'en plaine,<sup>26</sup> mais la FC maximale diminue avec l'altitude.<sup>46</sup> Avec l'acclimatation, la FC de repos et la FC maximale diminuent, en lien avec un phénomène de désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques.<sup>47</sup> La vasoconstriction induite par la stimulation sympathique est contrebalancée par un effet systémique vasodilatateur de l'hypoxie, ce qui fait qu'en pratique, à la phase initiale, la pression artérielle reste inchangée ou diminue légèrement, puis augmente modérément après quelques heures.<sup>15,26,30</sup>

Enfin, la diminution de la  $PAO_2$  lors d'une exposition aiguë en haute altitude va être responsable d'une très rapide vasoconstriction pulmonaire hypoxique (VPH), débutant dans les premières minutes d'exposition hypoxique.<sup>27</sup> Celle-ci est déclenchée, principalement en réponse à la diminution de la  $PAO_2$ , par un signal d'origine mitochondrial dans les cellules musculaires lisses des artérioles pulmonaires, conduisant à la fermeture de canaux potassiques et induisant une dépolarisation membranaire, permettant l'ouverture de canaux calciques, responsables d'un afflux intracytoplasmique de calcium aboutissant à une contraction des cellules musculaires lisses.<sup>48</sup> Une deuxième phase de VPH, se développant après 30 à 120 minutes d'exposition hypoxique, fait intervenir les cellules endothéliales pulmonaires et leurs

médiateurs vasoactifs comme l'endothéline-1.<sup>49</sup> La VPH va entraîner une augmentation de la pression artérielle pulmonaire, d'intensité variable en fonction des individus, à laquelle participe l'augmentation du DC.<sup>27,50</sup> L'augmentation résultante de la postcharge du ventricule droit contribue aux altérations de la mécanique cardiaque observées en altitude.<sup>45</sup> L'augmentation de la pression artérielle pulmonaire induite par l'exposition hypoxique est particulièrement marquée à l'exercice (avec l'augmentation du DC), et participe à la limitation des performances en altitude.<sup>51</sup> Ainsi, si la VPH représente un mécanisme physiologique essentiel pour le développement intra-utérin et particulièrement efficace pour préserver le rapport ventilation-perfusion lors d'une hypoxie alvéolaire focale (atélectasie, pneumonie), elle n'apporte aucun bénéfice dans l'acclimatation à l'altitude.<sup>48,50,52</sup> La VPH joue de plus un rôle clef dans la physiopathologie de l'œdème pulmonaire de haute altitude (OPHA), une pathologie spécifique à l'altitude (cf. infra).<sup>26,27</sup>

De manière intéressante, il a été montré ces dernières années que l'administration de fer par voie intra-veineuse atténue la VPH et permettait une diminution de la pression artérielle pulmonaire lors d'une exposition hypoxique ou lors d'une ascension en haute altitude, chez des sujets natifs de basse altitude.<sup>53-57</sup> L'administration de fer semble avoir un effet principalement lors de la deuxième phase de la VPH, en interagissant avec la voie de signalisation hypoxique HIF (figure 4).<sup>53,58,59</sup> En présence d'oxygène, la sous-unité HIF- $\alpha$  est hydroxylée par des prolyl-hydroxylases (PHD) puis est reconnue par la protéine von Hippel-Lindau et est dégradée par voie ubiquitine-protéasome.<sup>28,29</sup> En situation d'hypoxie, l'inactivation des PHD permet la stabilisation de HIF- $\alpha$ , qui va alors pouvoir jouer son rôle de facteur transcriptionnel (figure 4). Il est à noter que si trois isoformes de PHD ont été identifiées, la PHD-2 semble jouer un rôle prépondérant dans la régulation de la voie de HIF.<sup>28</sup> Le fer est un cofacteur essentiel des PHD.<sup>28</sup> Il est suggéré que même en situation d'hypoxie, chez des sujets sans carence martiale, l'augmentation de la biodisponibilité du fer consécutive à un apport parentéral permettrait aux PHD d'hydroxyler et donc d'inhiber la stabilisation de HIF- $\alpha$ , et empêcherait ainsi la transcription de gènes sous la dépendance de HIF contribuant à la vasoconstriction pulmonaire (incluant ceux codant pour l'endothéline-1 ou des canaux ioniques).<sup>58,59</sup>

## 1.4.2 La réponse hématologique et rénale à l'hypoxie

Une exposition hypoxique aiguë s'accompagne d'une rapide augmentation de la concentration sanguine en hémoglobine ([Hb], figure 3), permettant ainsi de contrebalancer l'effet de la diminution de la saturation en oxygène de l'hémoglobine ( $SaO_2$ ) sur le contenu artériel en oxygène ( $CaO_2$ ) et donc sur le transport artériel en oxygène ( $TaO_2$ ).<sup>a</sup> L'augmentation initiale de la [Hb] n'est pas liée à une augmentation du volume total des globules rouges (*red blood cell volume*, RBCV) en lien avec la stimulation de l'érythropoïèse induite par l'augmentation de la sécrétion d'EPO, mais est induite par une réduction du volume plasmatique (*plasma volume*, PV).<sup>60,61</sup> Cette « contraction » du PV, proportionnelle à l'altitude atteinte (et donc au degré d'hypoxie), débute dans les premières 24 heures et semble atteindre un plateau après quelques jours.<sup>62,63</sup> Les multiples mécanismes évoqués pour expliquer cette diminution du PV lors d'une exposition aiguë en haute altitude incluaient une augmentation de la diurèse (en lien notamment avec une diminution de l'activité du système rénine-angiotensine-aldostérone [SRAA] et une diminution de la sécrétion d'hormone antidiurétique), une majoration des pertes hydriques insensibles (en lien avec l'augmentation de la ventilation dans un environnement où l'air est moins humide), une diminution des apports hydriques, et une fuite liquidienne dans l'espace extravasculaire (en lien avec une augmentation de la perméabilité vasculaire induite par une inflammation systémique en réponse à l'hypoxie).<sup>60</sup> Cependant, tout récemment, deux études expérimentales conduites en chambre hypobare par la même équipe, chez l'homme, puis chez la femme, ont montré que la diminution du PV en hypoxie était expliquée par une redistribution liquidienne du milieu intra vers le milieu extravasculaire, médiée par un probable mécanisme oncotique, induit par une fuite protéique dans le milieu extravasculaire.<sup>64,65</sup> L'étude la plus récente, conduite chez des femmes, observait également une augmentation transitoire de la diurèse dans les premières heures d'exposition hypoxique, sans augmentation par la suite de la diurèse totale sur 24 heures, ni modification de la quantité d'eau corporelle totale.<sup>65</sup>

Enfin, lors de la redescente, le PV se réexpand rapidement et retrouve une valeur similaire à sa valeur pré-ascensionnelle dans la semaine suivant le retour à basse altitude.<sup>66</sup>

---

<sup>a</sup>  $CaO_2 = SaO_2/100 \times [Hb] \times 1,39 + PaO_2 \times 0,03$ , où 1,39 correspond au pouvoir oxyphorique de l'hémoglobine ou constante d'Hüfner (valeur théorique : 1,39 mL·g<sup>-1</sup> ; valeurs mesurées : 1,34 ou 1,36 mL·g<sup>-1</sup>)<sup>302,303</sup> et 0,03 correspond au coefficient de solubilité de l'oxygène dans le sang.

$TaO_2 = CaO_2 \times DC$ , où DC est le débit cardiaque.

L'augmentation du RBCV (ou de la masse totale d'hémoglobine,  $Hb_{mass}$ ) lors d'une exposition hypoxique en altitude, en réponse à l'augmentation de la sécrétion d'EPO par le rein, est un mécanisme beaucoup plus lent à se mettre en place, même si une augmentation du taux plasmatique d'EPO est observée dans les heures suivant l'exposition hypoxique (avec néanmoins une grande variabilité inter-individuelle).<sup>60,61</sup> Ainsi, une augmentation significative de l' $Hb_{mass}$  lors d'une exposition en altitude va nécessiter un stimulus hypoxique, à la fois significatif et prolongé, c'est-à-dire, de l'ordre d'au moins 2 semaines, à une altitude supérieure à 4000 m, même s'il existe, là encore, une grande variabilité inter-individuelle.<sup>67</sup> Cette augmentation de l' $Hb_{mass}$  en altitude n'est bien sûr possible qu'en l'absence de carence martiale. Lors du retour en plaine, de manière similaire à la réexpansion du PV, la décroissance du RBCV (et de l' $Hb_{mass}$ ) est également rapide, avec un retour à sa valeur pré-ascensionnelle dans un délai de l'ordre de 7 à 14 jours. Ainsi, deux semaines après un séjour de 28 jours à environ 3500 m d'altitude, la [Hb] a retrouvé sa valeur pré-ascensionnelle.<sup>66</sup>

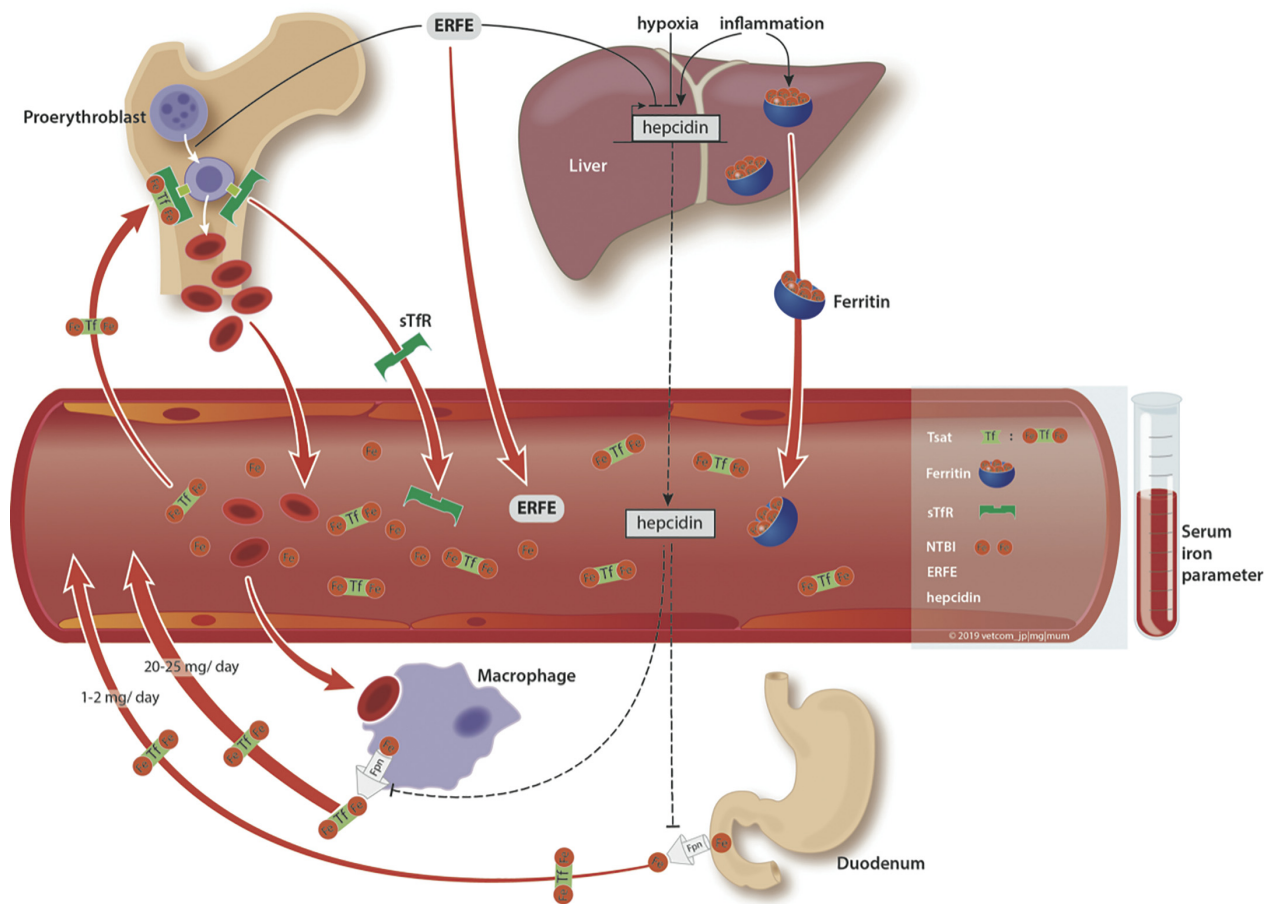
Le mécanisme de cette décroissance rapide du nombre de globules rouges après une exposition hypoxique en altitude reste sujet à débat, entre néocytolyse (c'est-à-dire la rapide et sélective destruction des jeunes globules rouges synthétisés lors du stress érythropoïétique induit par l'hypoxie)<sup>68</sup> ou une simple décroissance de l'activité érythropoïétique liée à l'arrêt du stimulus hypoxique et à la baisse de la sécrétion d'EPO.<sup>69-72</sup>

Enfin, le rôle du rein dans l'acclimatation à l'hypoxie ne se limite pas à la production d'EPO.<sup>29</sup> Comme nous l'avons vu plus haut, celui-ci joue un rôle clef dans l'acclimatation respiratoire, en permettant une compensation métabolique de l'alcalose induite par la RVH, par une augmentation de l'excrétion d'ions bicarbonates et une réabsorption d'ions  $H^+$ .<sup>73,74</sup> Si la compensation rénale semble effective pour normaliser en quelques jours le pH lors d'une exposition hypoxique jusqu'à ~4000 m,<sup>6,16</sup> à des altitudes supérieures, la compensation métabolique reste incomplète et une légère alcalose persiste,<sup>6,75</sup> même après plusieurs semaines d'exposition.<sup>76,77</sup> L'existence d'une diurèse hypoxique, participant à la diminution du PV,<sup>66,74</sup> est particulièrement remise en cause par des études récentes.<sup>64,65</sup> Enfin, si une diminution de l'activité du SRAA et une diminution de la sécrétion d'hormone antidiurétique ont souvent été observées lors d'une exposition aiguë en altitude,<sup>66,74</sup> une rétention hydrique et une diminution de la diurèse, possiblement en lien avec une augmentation de la sécrétion d'hormone

antidiurétique et une activation du SRAA, ont été décrites comme associées avec l'occurrence d'un mal aigu des montagnes (MAM), c'est-à-dire avec une mauvaise acclimatation.<sup>74,78,79</sup>

### 1.4.3 Métabolisme du fer lors d'une exposition aiguë en altitude

Lors d'une exposition aiguë en altitude, chez un sujet vivant en plaine, l'augmentation de l'activité érythropoïétique va s'accompagner d'une mobilisation des réserves en fer de l'organisme.<sup>55,80-82</sup> Cette mobilisation des réserves en fer (contenues dans les macrophages et les hépatocytes), associée à une augmentation de l'absorption intestinale de fer par les entérocytes, est possible grâce à la suppression de l'hepcidine, hormone produite par le foie, qui contrôle la mobilisation des réserves en fer, en modulant l'expression de la ferroportine au niveau des membranes cellulaires ; la ferroportine étant la protéine transmembranaire permettant l'externalisation du fer de l'intérieur vers l'extérieur des cellules. Une diminution de l'hepcidine va donc permettre, via l'expression de la ferroportine à la surface des cellules, une mobilisation des réserves en fer et une augmentation de l'absorption intestinale du fer. Il est à noter que l'absorption du fer par les entérocytes n'est pas seulement sous la dépendance de l'hepcidine et qu'en situation d'hypoxie ou de déficience en fer, la stabilisation de HIF-2 $\alpha$  dans les entérocytes va stimuler la transcription génique de protéines impliquées dans l'absorption intestinale du fer. En situation d'hypoxie, la synthèse d'hepcidine est principalement régulée à la baisse par l'érythroferrone (ERFE), hormone récemment découverte et produite par les proérythroblastes et les érythroblastes en réponse à la stimulation érythropoïétique induite par l'EPO. À l'inverse de l'ERFE, l'inflammation (par l'intermédiaire de l'interleukine 6, IL-6) ou des réserves élevées en fer (par l'intermédiaire de la voie de signalisation BMP/SMAD) vont induire une régulation à la hausse de l'hepcidine, conduisant à une internalisation de la ferroportine et donc à une diminution de l'expression de cette protéine transmembranaire à la surface des cellules.<sup>83-85</sup> L'axe EPO-ERFE-hepcidine (résumé dans la figure 5) est donc fondamental pour la régulation du métabolisme du fer et pour permettre une expansion du RBCV lors d'une exposition hypoxique en altitude. Ainsi, une augmentation du taux plasmatique d'ERFE et une diminution du taux plasmatique d'hepcidine ont bien été décrits lors d'une exposition hypoxique aiguë en altitude.<sup>80,81,86-88</sup>



**Figure 5 : Marqueurs du métabolisme du fer et régulation du métabolisme du fer par l'axe EPO-ERFE-hepcidine. D'après Muckenthaler et al.<sup>82</sup>**

La majorité du stock en fer de l'organisme est utilisée par les globules rouges pour le transport de l'oxygène via l'hémoglobine (~2000 mg). Les réserves en fer sont majoritairement situées dans le foie (~1000 mg), alors que 20 à 25 mg de fer, issus des globules rouges sénescents, sont recyclés chaque jour par les macrophages. Les pertes en fer de l'organisme (desquamation cellulaire, saignement), faibles en situation physiologique, sont compensées par l'absorption entérocytaire du fer issu de l'alimentation au niveau du duodénum (1 à 2 mg/jour). En situation d'hypoxie, l'érythropoïèse est stimulée par l'érythropoïétine (EPO) sécrétée par les reins (non représenté sur la figure). En retour, les proérythroblastes et les érythroblastes sécrètent l'érythroferrone (ERFE) qui inhibe la synthèse hépatique d'hepcidine. À l'inverse, la synthèse d'hepcidine peut être stimulée par l'inflammation, via l'interleukine 6 (IL-6) ou par des réserves en fer élevées via la voie de signalisation BMP/SMAD (non représentée sur la figure). L'inhibition de l'hepcidine permet la mobilisation des réserves en fer lié à la ferritine (qui est la protéine intracytoplasmique permettant le stockage du fer) présentes dans les macrophages et dans les hépatocytes, ainsi qu'une augmentation de l'absorption intestinale du fer, grâce à l'augmentation de l'expression membranaire de la ferroportine (Fpn). La transferrine permet le transport du fer aux précurseurs érythroïdes qui l'incorporent grâce à un récepteur membranaire, le récepteur de la transferrine (*transferrin receptor*, TfR). La forme soluble du récepteur à la transferrine (*soluble transferrin receptor*, sTfR), issue de la protéolyse membranaire, est un marqueur de l'activité érythropoïétique et sa concentration est par ailleurs

inversement corrélée à la quantité de fer disponible pour l'érythropoïèse. Le coefficient de saturation de la transferrine (*transferrin saturation*, Tsat) est un marqueur de carence martiale lorsqu'il est inférieur à 16%, et de surcharge en fer, lorsqu'il est supérieur à 40%. La quantité de fer libre circulant dans le sang est faible (*non-transferrin-bound iron*, NTBI) ; son augmentation, lorsque la capacité de saturation de la transferrine est dépassée, est potentiellement toxique.<sup>82-85</sup>

#### **1.4.4 Pathologies spécifiques liées à l'altitude**

On entend par pathologies spécifiques liées à l'altitude, les pathologies liées à une mauvaise adaptation à l'hypoxie,<sup>2</sup> lors d'une exposition aiguë en altitude, et incluant le mal aigu des montagnes (MAM), l'œdème cérébral de haute altitude (OCHA) et l'œdème pulmonaire de haute altitude (OPHA). Ces pathologies sont surtout rencontrées en haute altitude (au-dessus de 2500 m), mais des MAM et OPHA ont été décrits en moyenne altitude (< 2500 m), chez des sujets probablement prédisposés.<sup>89,90</sup> Ces pathologies ont fait l'objet de nombreuses revues de la littérature,<sup>11-13,16,26,27,91-93</sup> mais restent globalement mal connues des voyageurs,<sup>94</sup> ainsi que des professionnels de santé, même dans les pays particulièrement concernés du fait de leur géographie.<sup>95</sup> Le facteur de risque principal et commun à ces pathologies est une ascension trop rapide et trop haute, exposant ainsi brutalement l'organisme à une hypoxie d'emblée sévère et ne laissant pas le temps à la mise en place des mécanismes de réponse à l'hypoxie précédemment développés, c'est-à-dire, ne permettant pas une acclimatation.<sup>12,13,27,93</sup> Par ailleurs, dans une large cohorte de voyageurs en haute altitude, Richalet et coll.<sup>42</sup> retrouvaient comme principaux facteurs de risque associés à la survenue d'une pathologie sévère d'altitude (OPHA, OCHA ou MAM sévère), un rythme d'ascension rapide (> 400 m/j), un antécédent de pathologie sévère d'altitude ou de migraine, ainsi que des paramètres physiologiques, déterminés lors d'un test d'effort en hypoxie réalisé avant le voyage en altitude (à 30% de la puissance maximale aérobie, avec une FiO<sub>2</sub> à 11,5%, correspondant environ à une altitude simulée de 4800 m),<sup>96</sup> incluant une faible réponse ventilatoire et une faible réponse cardiaque (chronotrope), ainsi qu'une désaturation importante à l'effort en hypoxie.

##### **1.4.4.1 Mal aigu des montagnes**

Dans sa forme classique, le MAM correspond à un certain nombre de symptômes non spécifiques (céphalées, perte d'appétit, nausées/vomissements, fatigue, vertiges, troubles du sommeil) susceptibles de se manifester lors d'une exposition aiguë en altitude, chez un individu vivant habituellement en basse altitude et non acclimaté. Parmi ces symptômes, le symptôme

clef est la présence de céphalées dont les caractéristiques sémiologiques précises en tant que céphalées secondaires (*high-altitude headache*) ont été décrites.<sup>97</sup> Le diagnostic positif de MAM ainsi que son degré de sévérité (léger, modéré ou sévère) sont évalués grâce à des questionnaires cliniques, dont les plus connus sont le score de Hackett (plus facile à utiliser pour des non-spécialistes) et le score de Lake Louise (faisant référence en recherche).<sup>98,99</sup> Il est à noter que la présence de céphalées est un critère obligatoire dans le score de Lake Louise pour porter le diagnostic de MAM et que le critère « trouble du sommeil » a été retiré du score de Lake Louise dans sa dernière version datant de 2018.<sup>100</sup> La prévalence du MAM augmente avec l'altitude : si celle-ci est de l'ordre de 25% à 3500 m, au-dessus de 6000 m, plus de 50% des voyageurs sont affectés par le MAM.<sup>99</sup>

Le MAM survient généralement après une période initiale de quelques heures (dite « phase blanche »), pendant laquelle aucun symptôme n'est ressenti, ou au décours de la 1<sup>ère</sup> nuit en altitude, pendant laquelle le niveau d'hypoxie est généralement plus important, principalement chez les individus présentant une faible RVH.<sup>101,102</sup> Le schéma physiopathologique exact conduisant aux symptômes du MAM, et notamment aux céphalées, reste imparfaitement compris mais semble faire intervenir initialement une activation du système trigémino-vasculaire, via la vasodilatation cérébrale induite par l'hypoxie ; cette vasodilatation cérébrale, potentiellement associée à un léger œdème cérébral, entraîne une augmentation de la pression intracrânienne.<sup>102,103</sup> La diminution du retour veineux cérébral en position allongée participe à la majoration nocturne des symptômes.<sup>103</sup> Par ailleurs, en fonction du délai de survenue du MAM, une classification en 3 types a été récemment proposée, avec des mécanismes physiopathologiques potentiellement différents pour chaque type.<sup>102</sup>

Le traitement préventif du MAM repose sur une ascension lente et progressive, basée sur des paliers de repos nocturne. Il est ainsi recommandé, au-dessus de 3000 m, de ne pas dépasser 500 m d'élévation supplémentaire par nuit et de prendre une journée supplémentaire de repos à chaque palier de 1000 m, ces seuils théoriques pouvant être modulés en fonction de la tolérance et de la susceptibilité individuelle.<sup>104</sup> Chez les voyageurs en haute altitude considérés à risque de MAM,<sup>96</sup> ou ne pouvant respecter un rythme d'ascension lent et progressif,<sup>105</sup> un traitement prophylactique par acétazolamide (ACZ) doit être considéré, en l'absence de contre-indications (allergie aux sulfamides, déficit en G6PD, troubles métaboliques, insuffisance rénale sévère, grossesse et allaitement, antécédent de colique néphrétique...).<sup>104</sup> Les effets secondaires les plus fréquents de l'ACZ incluent des paresthésies et une dysgueusie aux boissons gazeuses, qui

sont dose-dépendantes.<sup>106</sup> L'ACZ, en inhibant l'anhydrase carbonique au niveau des tubules rénaux, va provoquer une excrétion de bicarbonates, et donc une légère acidose métabolique. Cette acidose métabolique va entraîner une compensation respiratoire, et donc une hyperventilation, qui va permettre une augmentation de la PaO<sub>2</sub>. En dehors de cet effet bénéfique sur l'acclimatation respiratoire, il a été suggéré que l'ACZ pouvait avoir un effet cérébral direct anti-œdémateux, cytoprotecteur et anti-inflammatoire en situation d'hypoxie, intéressant dans la prévention ou le traitement du MAM.<sup>107</sup>

En cas de survenue d'un MAM en altitude, l'attitude thérapeutique va dépendre de la sévérité du MAM. La survenue d'un MAM léger à modéré sera traitée de manière symptomatique (paracétamol, anti-nauséeux), avec un repos à altitude fixe le temps de l'amélioration des symptômes. Un traitement par ACZ peut alors aider à l'acclimatation. Une surveillance accrue est nécessaire et une aggravation des symptômes doit conduire à une redescente, une perte d'altitude de 500 à 1000 m étant généralement suffisante pour améliorer la symptomatologie. En cas de MAM sévère, la priorité est la descente rapide, afin d'améliorer l'oxygénation du patient. Si la descente ou l'évacuation est impossible, une réoxygénation est nécessaire, en utilisant de l'oxygène (si disponible) ou un caisson hyperbare portable. Le traitement médicamenteux de référence du MAM sévère repose alors sur l'administration de dexaméthasone, éventuellement associé à de l'ACZ.<sup>12,104</sup>

Enfin, l'apparition d'œdèmes localisés de haute altitude (OLHA), siégeant au niveau des extrémités, ou faciaux (et sous-palpébraux) a été décrite en haute altitude, de manière isolée, ou associée à un MAM. Ils témoignent d'une rétention hydrique et d'une acclimatation imparfaite.<sup>2,108</sup>

#### **1.4.4.2 Œdème cérébral de haute altitude**

L'OCHA est souvent considéré comme un MAM qui s'aggrave, même s'il peut survenir sans symptôme préalable. Celui-ci survient rarement en dessous de 3500-4000 m et sa prévalence est estimée entre 0,5 et 1%. Il existe initialement des signes neuropsychiques (modification de l'humeur, altération du jugement, hallucinations...), une ataxie cérébelleuse avec une démarche ébrieuse, des signes d'hypertension intracrânienne (céphalées rebelles, vomissements en jet), puis une altération de la vigilance pouvant rapidement évoluer vers un coma et un décès. La présence de signes de focalisation doit faire évoquer un diagnostic alternatif. L'OCHA peut être associé à un OPHA. Les facteurs favorisants sont les mêmes que pour le MAM.<sup>11,12,14,27</sup> La physiopathologie initiale de l'OCHA partage des similitudes avec la

physiopathologie du MAM, avec une évolution marquée par un œdème d'origine mixte, cytotoxique et vasogénique, se compliquant d'une hypertension intracrânienne lorsque la compliance cérébrale s'effondre en raison d'un dépassement des mécanismes compensateurs.<sup>23,102,103</sup> L'OCHA, du fait du risque d'évolution rapide vers un engagement cérébral et un décès, est une urgence thérapeutique, impliquant une redescente le plus rapidement possible à l'altitude la plus basse possible. En cas d'impossibilité de descente rapide, le traitement est basé sur une administration d'oxygène et/ou une recompression dans un caisson hyperbare portable, associé à l'administration de dexaméthasone, dans l'attente de pouvoir redescendre.<sup>104</sup>

#### **1.4.4.3 Œdème pulmonaire de haute altitude**

L'OPHA est un œdème pulmonaire non cardiogénique, survenant dans les premiers jours suivant une exposition en haute altitude, le plus souvent au-dessus de 3000 m (même si des formes d'OPHA ont été décrites en moyenne altitude<sup>90</sup>), et pouvant survenir même en l'absence de signe de MAM. Des OPHA dits de réentrées, ont été également décrits chez des résidents de haute altitude revenant d'un séjour à une altitude plus basse.<sup>11</sup> Les signes précoces d'OPHA sont une dyspnée d'effort, une toux sèche et une diminution de la performance à l'effort. La progression de l'OPHA va entraîner une aggravation de la dyspnée et la toux, une orthopnée, des expectorations mousseuses et rosées puis un tableau d'insuffisance respiratoire aiguë hypoxémiant. L'examen clinique peut alors retrouver des signes de détresse respiratoire, une cyanose, une tachycardie, une fébricule et des crépitations auscultatoires.<sup>11,12,14,27</sup>

La physiopathologie de l'OPHA fait intervenir en premier lieu une VPH exagérée et de surcroît inhomogène dans le territoire vasculaire pulmonaire ; ainsi, les zones pulmonaires non ou moins vasoconstrictées vont subir une surperfusion (majorée à l'exercice du fait de l'augmentation du DC), conduisant à des ruptures capillaires et à la formation d'un œdème interstitiel, puis alvéolaire, exsudatif. Des mécanismes inflammatoires participent également à la dysfonction endothéliale pulmonaire. L'œdème alvéolaire est également favorisé par une diminution de la clairance liquidienne alvéolaire, en lien avec une inhibition en hypoxie des systèmes de transport ionique transmembranaires dans les cellules épithéliales alvéolaires.<sup>27,109,110</sup>

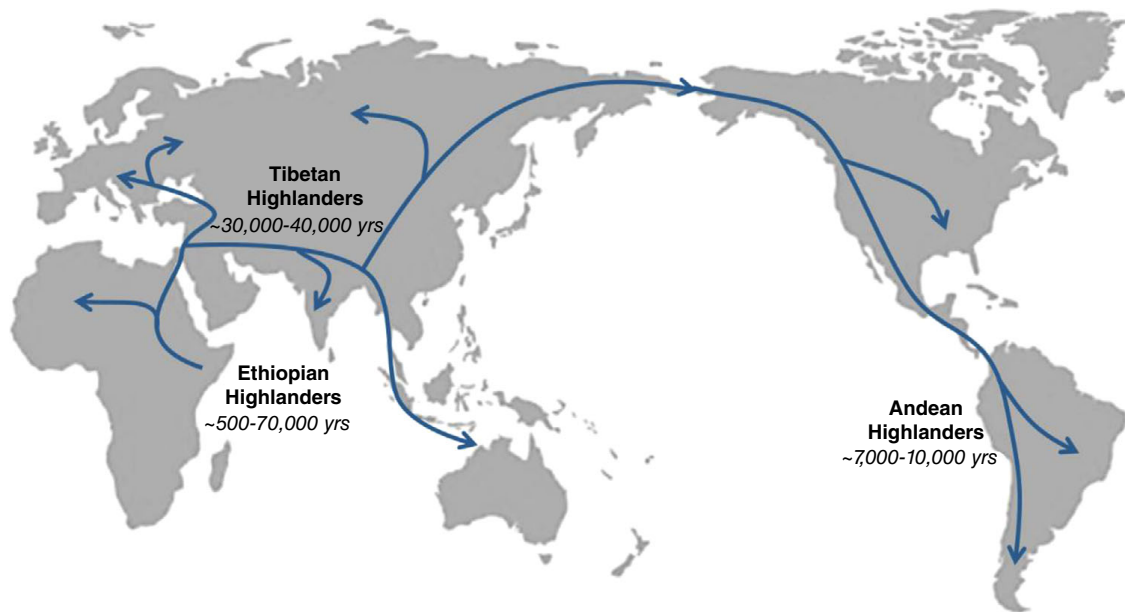
Les facteurs de risque principaux d'OPHA sont une ascension trop rapide et trop haute et une susceptibilité individuelle, incluant notamment une plus faible réponse ventilatoire hypoxique et une forte VPH.<sup>11,109</sup> D'autres facteurs de risque, comme l'activité physique, une infection virale contemporaine ou récente des voies aériennes supérieures, ainsi que la présence d'un foramen ovale perméable, sont discutés dans la littérature.<sup>27,109,111</sup> La prévalence rapportée de

l'OPHA varie grandement, entre 0,2 et 15% au-dessus de 4000 m, en fonction du rythme d'ascension.<sup>11,12</sup>

De manière similaire à l'OCHA, l'OPHA nécessite une descente rapide à basse altitude, en évitant les efforts physiques pouvant augmenter la pression artérielle pulmonaire et donc aggraver l'œdème. En l'absence de possibilité de redescente rapide, une stratégie de réoxygénation doit être mise en place (apport d'oxygène ou utilisation d'un caisson hyperbare portable). Le traitement médicamenteux de l'OPHA repose sur l'administration d'un traitement vasodilatateur pulmonaire : inhibiteurs calciques (nifédipine) ou inhibiteurs de la 5-phosphodiesterase (sildénafil, tadalafil).<sup>104</sup>

### **1.5 Mécanismes d'adaptation lors de la vie permanente en haute altitude**

Comme nous l'avons précisé précédemment, il est actuellement estimé que 81,6 millions de personnes (représentant 1,07% de la population mondiale) résident de manière permanente à une altitude supérieure ou égale à 2500 m. Parmi elles, 14,4 millions de personnes résident à plus de 3500 m d'altitude.<sup>21</sup> Ces populations de haute altitude sont majoritairement installées en Amérique du Sud dans les Andes (Aymara et Quechua), en Asie Centrale sur le plateau tibétain (Tibétains et Sherpas) et en Afrique sur les haut-plateaux éthiopiens (Amhara), depuis des milliers d'années (figure 6) ; si les durées de résidence de ces populations en haute altitude sont parfois soumises à débat, il est communément admis que les populations éthiopiennes (exception faite de la population Oromo, ayant migré sur les hauts plateaux il y a environ 500 ans) et tibétaines sont installées en haute altitude depuis bien plus longtemps que la population andéenne.<sup>9,10,112</sup>



**Figure 6 : Principales populations de haute altitude et durées proposées de résidence en haute altitude. D’après Tymko et coll.<sup>112</sup>**

### 1.5.1 Des populations et des phénotypes

Ces milliers d’années de vie permanente en haute altitude (figure 6) ont permis aux populations andéennes, tibétaines et éthiopiennes de s’adapter, c’est-à-dire d’acquérir au fil d’une sélection naturelle, des caractéristiques phénotypiques leur permettant de faire face à leur environnement hypoxique, et donc d’optimiser le transport et la délivrance tissulaire en oxygène.<sup>10</sup> Ces caractéristiques phénotypiques diffèrent d’une population à l’autre et les principales caractéristiques phénotypiques de ces populations sont résumées dans le tableau 1. Si les mécanismes adaptatifs des populations tibétaines et andéennes ont été largement étudiés, les mécanismes adaptatifs de la population éthiopienne le sont moins.<sup>10,113–115</sup> Les comparaisons entre les différentes populations restent néanmoins difficiles, du fait d’études conduites à des altitudes différentes, avec une méthodologie pas toujours identique. Il est par ailleurs considéré que la population Sherpa, issue de la population tibétaine dans la région du Khumbu, est particulièrement bien adaptée à la vie permanente en haute altitude.<sup>116,117</sup>

**Tableau 1 : Principales caractéristiques physiologiques des habitants de haute altitude (Andéens, Tibétains et Éthiopiens) vivant entre 3500 et 4500 m. Adapté d'après Luks et coll.<sup>1</sup>**

	Tibétains	Andéens	Éthiopiens
<b>Adaptations hématologiques</b>			
<b>[Hb] (g·dL<sup>-1</sup>)</b>	14-16	18-20	15-16
<b>RBCV</b>	Élevé	Élevé	Non connu
<b>PV</b>	Élevé	Faible	Non connu
<b>BV</b>	Élevé	Élevé	Non connu
<b>Adaptations respiratoires</b>			
<b>RVH</b>	Élevé	Faible	Normal
<b>SaO<sub>2</sub> (%)</b>	88-92	92-94	95
<b>Ventilation</b>	Élevé	Normal/Faible	Faible
<b>Adaptations circulatoires</b>			
<b>DC</b>	Normal	Normal	Non connu
<b>PAPs</b>	Élevé*	Élevé	Élevé

[Hb], concentration d'hémoglobine ; RBCV, *red blood cell volume* ; PV, *plasma volume* ; BV, *blood volume* ; RVH, réponse ventilatoire hypoxique ; DC, débit cardiaque ; PAPs, pression artérielle pulmonaire systolique.

\* Similaire à celle d'habitants de plaine acclimatés.

### 1.5.2 Adaptation hématologique

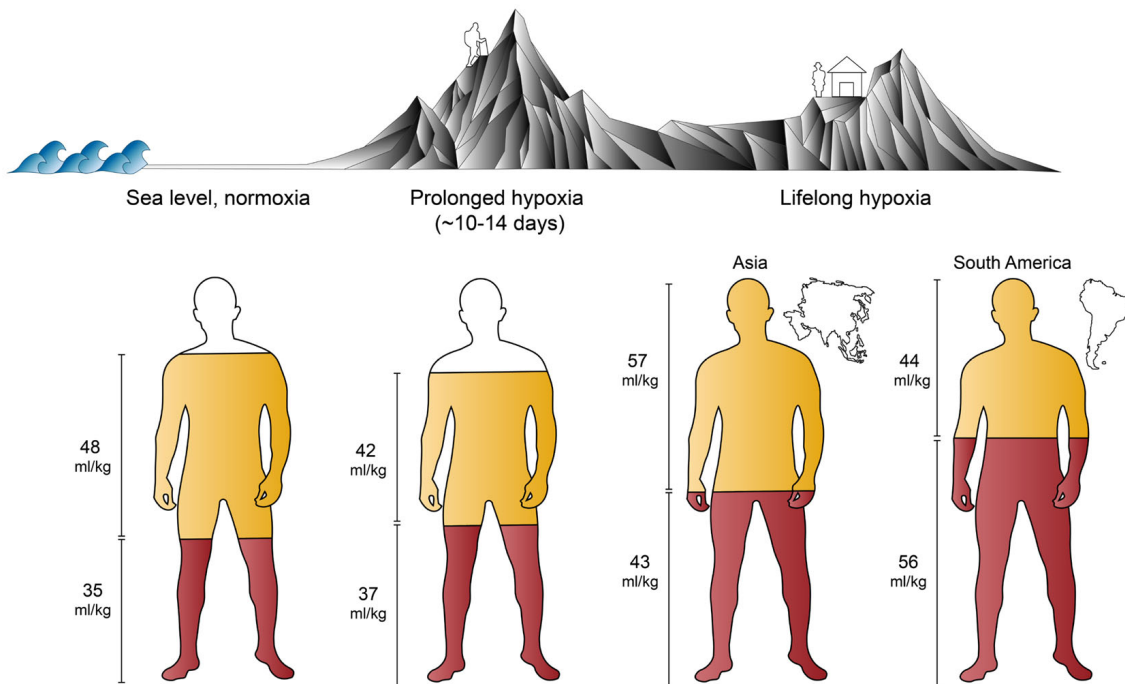
L'augmentation de la [Hb] est un mécanisme important dans l'acclimatation à l'altitude, en lien avec une diminution initiale du PV, puis une augmentation secondaire de l'Hb<sub>mass</sub> comme nous l'avons développé précédemment.<sup>60</sup> Chez les résidents permanents de haute altitude, une augmentation de la [Hb] constitue également un mécanisme adaptatif clef. De manière intéressante, si l'on observe une augmentation progressive et linéaire de la [Hb] avec l'augmentation de l'altitude de résidence, celle-ci est n'a pas la même magnitude dans toutes les populations.<sup>61</sup> Ainsi l'augmentation de la [Hb] est particulièrement marquée dans les populations andéennes (+ 1 g·dL<sup>-1</sup>·km<sup>-1</sup>) par rapport aux autres régions du globe (+ 0,6 g·dL<sup>-1</sup>·km<sup>-1</sup>).<sup>118</sup> De manière similaire qu'en plaine, les femmes présentent en altitude des [Hb] plus

basses que les hommes, mais les études portant plus spécifiquement sur les femmes sont malheureusement rares.<sup>61,118</sup>

Pour un niveau d'altitude similaire, la [Hb] est plus élevée chez les Andéens que chez les Tibétains.<sup>114</sup> De manière intéressante, et peut-être contre-intuitive, une [Hb] plus basse n'est pas forcément un désavantage adaptatif et une relation inverse entre [Hb] et le pic de consommation d'oxygène ( $\dot{V}O_2$  pic) a été rapportée chez des Tibétains.<sup>119</sup> Les modifications sous-jacentes en termes de volumes intravasculaires n'ont été que récemment comparées entre Andéens et Tibétains.<sup>120</sup> Les Andéens et les Tibétains présentent des BV similaires, bien plus élevés que les habitants de plaine. La différence de [Hb] entre Tibétains et Andéens, s'explique à la fois par un RBCV plus élevé chez les Andéens mais également par un PV plus élevé chez les Tibétains que chez les Andéens. Même s'il est inférieur à celui des Andéens, le RBCV des Tibétains reste bien supérieur à celui des habitants de plaine (figure 7).<sup>120</sup> L'association d'une augmentation modérée du RBCV (par rapport aux Andéens), associée à une augmentation du PV, pourraient permettre une augmentation de la capacité de transport de l'oxygène, sans compromettre la microcirculation par une augmentation importante de la viscosité sanguine et donc représenter un mécanisme adaptatif particulièrement intéressant pour le maintien de la capacité à l'exercice en haute altitude chez les Tibétains.

Malgré une demande érythropoïétique plus importante, les résidents adultes de haute altitude semblent maintenir leurs réserves en fer dans des normes similaires aux habitants de plaine.<sup>82</sup> Peu de données ont été publiées concernant l'axe EPO-ERFE-hepcidine dans les populations de haute altitude. Contrairement à la suppression de l'hepcidine observée lors d'une exposition aiguë en altitude chez des habitants de plaine,<sup>81,86</sup> les Éthiopiens exposés de manière permanente à l'hypoxie et ayant donc une demande érythropoïétique stable, présentent des concentrations plasmatiques d'hepcidine dosables, avec quelques différences en fonction des ethnies ; ainsi, chez les Amarha présentant à ~4000 m une [Hb] plus faible que les Omoro et des stocks de fer plus importants, la concentration plasmatique d'hepcidine est plus élevée que chez les Omoro, probablement en raison d'une demande en fer plus faible.<sup>121</sup> À notre connaissance, il n'existe pas de données similaires publiées concernant la régulation du métabolisme du fer, dans les autres populations de haute altitude, et notamment dans la population andéenne, chez qui l'augmentation de la [Hb] avec l'altitude est la plus marquée.<sup>61,118</sup>

Enfin, une augmentation excessive de la [Hb] est considérée comme une maladaptation et représente la pierre angulaire du mal chronique des montagnes, un syndrome maladaptatif touchant les populations de haute altitude.<sup>10,24</sup>



**Figure 7** : Comparaison des volumes intravasculaires entre les habitants de plaine (au niveau de la mer et lors d'un séjour en haute altitude) et les habitants de haute altitude (Tibétains et Andéens). D'après Williams et coll.<sup>45</sup>

Chez les habitants de plaine, un séjour en haute altitude s'accompagne dans un premier temps d'une augmentation de la concentration d'hémoglobine ([Hb]) en lien avec une contraction du volume plasmatique (*plasma volume*, PV), et donc d'une réduction initiale du volume sanguin total (*blood volume*, BV) ; en cas de séjour prolongé (plusieurs semaines, mois), l'augmentation du volume total de globules rouges (*red blood cell volume*, RBCV) en lien avec la stimulation de l'érythropoïèse entrainera une augmentation progressive du BV (non représenté sur la figure). Les habitants de haute altitude possèdent un BV plus élevé que les habitants de plaine et similaire entre Andéens et Tibétains. Les Andéens possèdent une [Hb] plus élevée que les Tibétains (et que les habitants de plaine), du fait d'un RBCV plus important, associé à un PV plus faible. Les Tibétains présentent une [Hb] similaire aux habitants de plaine acclimatés, malgré un RBCV légèrement plus élevé, en lien avec un PV plus important.

### 1.5.3 Adaptation ventilatoire

À ~4000 m, les Tibétains ont une ventilation de repos plus importante que celle des Andéens. La RVH des Tibétains est similaire à celle mesurée chez des habitants de basse altitude alors que les Andéens présentent généralement une RVH plus faible.<sup>114</sup> Cependant, malgré ces différences ventilatoires, Tibétains et Andéens présentent globalement des niveaux de PaO<sub>2</sub> et de SaO<sub>2</sub> similaires à ~4000 m.<sup>6,114</sup>

### 1.5.4 Adaptation cardiaque et circulatoire

Malgré l'hypoxie chronique, la fonction endothéliale systémique des Tibétains et des Andéens semble préservée et similaire aux habitants de plaine.<sup>112</sup> Le DC n'est pas particulièrement modifié dans ces populations adaptées à la vie permanente en haute altitude ; cependant, en comparaison aux populations de basse altitude, il existe un remodelage des cavités cardiaques (augmentation du volume et hypertrophie du ventricule droit, diminution du volume télédiastolique du ventricule gauche), principalement en lien avec l'augmentation de la postcharge du ventricule droit secondaire à la VPH et à l'interdépendance ventriculaire.<sup>45,122</sup>

L'élévation de la pression artérielle pulmonaire avec l'altitude est moins marquée chez les Tibétains en comparaison aux Andéens, de manière concordante avec des niveaux de monoxyde d'azote exhalé supérieurs chez les Tibétains.<sup>114</sup> Groves et coll.<sup>123</sup> observaient ainsi à Lhasa (Tibet, 3658 m), dans un petit effectif (n=5) de Tibétains résidant au-dessus de 3600 m, une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) de 15 ± 1 (moyenne ± erreur-type) mmHg et des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) de 1,8 ± 0,2 (moyenne ± erreur-type) UW, valeurs comparables à des valeurs normales au niveau de la mer. Au décours d'une ascension à 5050 m, Willie et coll.<sup>55</sup> retrouvaient des valeurs de PAPm et de RVP (estimées par échocardiographie) similaires entre habitants de plaine et Sherpas.

L'analyse groupée de différentes études majoritairement conduites dans les Andes met en évidence une augmentation hyperbolique de la PAPm avec l'altitude de résidence, pouvant aboutir à une hypertension pulmonaire de haute altitude (*high-altitude pulmonary hypertension*, HAPH), en lien avec un remodelage de la vascularisation pulmonaire caractérisé notamment par une musculation des artérioles pulmonaires.<sup>124</sup> Chez ces habitants de haute altitude, il existe également une part de VPH rapidement réversible, associée, puisque l'administration

d'oxygène permet une diminution significative, mais partielle, de la PAPm ; une réversibilité progressive de l'HAPH est par ailleurs observée lors d'une relocalisation à basse altitude.<sup>124,125</sup> L'HAPH est définie par un consensus de 2005 de l'*International Society for Mountain Medicine* comme une PAPm supérieure à 30 mmHg ou une pression artérielle pulmonaire systolique (PAPs) supérieure à 50 mmHg, chez un résident de haute altitude (au-dessus de 2500 m).<sup>126</sup> Il est à noter que ces seuils sont bien plus élevés que ceux utilisés pour définir l'hypertension pulmonaire au niveau de la mer (PAPm > 20 mmHg depuis le dernier consensus de 2019).<sup>127</sup> Néanmoins, en pratique, dans une méta-analyse regroupant des études majoritairement conduites entre 3600 m et 4300 m dans les Andes, l'augmentation de la PAPs au repos chez les habitants de haute altitude était le plus souvent relativement modérée (PAPs moyenne : 25 mmHg, [intervalle de confiance à 95% : 24-27 mmHg]), en faveur d'une faible prévalence de l'HAPH dans cette gamme d'altitude de résidence.<sup>128</sup>

Enfin, de manière similaire à l'effet observé chez des habitants de basse altitude lors d'une exposition en haute altitude, une administration intra-veineuse de fer entraînait une diminution de la PAPs au repos chez des Sherpas (à 5050 m) et des Andéens (à 4300 m) en bonne santé, dans deux études récemment publiées, suggérant, là encore, une réactivité vasculaire pulmonaire conservée.<sup>54,55</sup>

### **1.5.5 Adaptation musculaire et métabolique**

Les Tibétains vivant en haute altitude semblent présenter un réseau de capillaires musculaires plus dense, en comparaison aux Andéens et aux habitants de plaine, permettant probablement une meilleure diffusion périphérique de l'oxygène aux tissus. Les Tibétains et les Andéens présentent une densité mitochondriale plus faible que les habitants de plaine, laissant supposer une plus grande efficacité métabolique.<sup>114</sup> Ainsi, une adaptation métabolique incluant une meilleure efficacité dans l'utilisation tissulaire de l'oxygène a été récemment mise en évidence sur des biopsies musculaires réalisées chez des Sherpas.<sup>129</sup>

### 1.5.6 Gènes impliqués dans l'adaptation à la vie en haute altitude

Les différences phénotypiques entre les différentes populations vivant en haute altitude depuis plusieurs milliers d'années, ainsi que leur espacement géographique, laissent supposer des adaptations génétiques différentes. Ainsi, des gènes candidats différents, ou communs (avec des variants différents), ont été identifiés dans les populations tibétaines, andéennes et éthiopiennes ; certains de ces gènes participent à des processus biologiques tel que l'angiogenèse, le système circulatoire ou la réponse érythropoïèse et/ou sont impliqués dans la voie de HIF (c'est-à-dire régulant HIF ou étant régulés par HIF).<sup>10,130,131</sup> Ainsi, des variants spécifiques des gènes EGLN1 (codant pour la PHD-2) et EPAS1 (codant pour HIF-2 $\alpha$ ) ont été identifiés dans la population tibétaine.<sup>10,131</sup> Il a été proposé que ces variants étaient hypomorphes et entraînaient une diminution de l'activité de la PHD-2 en hypoxie (associée avec une RVH augmentée) et une diminution de l'activité de HIF-2 $\alpha$ , responsable d'une diminution de la réponse érythropoïétique et d'une diminution de la pression artérielle pulmonaire.<sup>132</sup> Chez les andéens, un variant d'EGLN1 différent a été identifié, et des variants de gènes impliqués par exemple dans la vasorégulation, dans la croissance vasculaire ou dans l'activité antioxydante ont été identifiés.<sup>133</sup> Des mécanismes épigénétiques, impliquant une modification de l'expression génique en fonction de l'environnement (le plus souvent par un mécanisme de méthylation de l'ADN), ainsi que leur héritabilité potentielle, participent très probablement à l'adaptation à la vie permanente en hypoxie, même si les connaissances dans ce domaine restent à ce jour limitées.<sup>134</sup>

## 1.6 La maladaptation à la vie permanente en haute altitude : le mal chronique des montagnes (*chronic mountain sickness*)

### 1.6.1 Éléments historiques

En 1925, le Dr Carlos Monge Medrano, médecin péruvien, présente à l'Académie de Médecine de Lima, dans une communication intitulée « *Sobre un caso de enfermedad de Vaquez* », une association entre altitude et polyglobulie, qu'il dénomme érythémie d'altitude.<sup>135</sup> En 1928, il décrit dans « *La Enfermedad de los Andes (Síndromes Eritrémicos)* », les signes et symptômes associés à cette polyglobulie d'altitude, chez des natifs ou résidents de haute

altitude, attribués à une perte ou à une inhabilité d'adaptation à la vie en altitude.<sup>136</sup> Ce syndrome prendra par la suite le nom de mal chronique des montagnes (*chronic mountain sickness*, CMS) ou maladie de Monge et sera complété par de nombreuses observations rapportant des données cliniques et hématologiques ; l'appellation « érythrocytose excessive » (*excessive erythrocytosis*, EE) est alors préférée pour qualifier la polyglobulie d'altitude. Les signes et symptômes classiquement décrits initialement incluaient une fatigue, une perte d'appétit, des vertiges, des acouphènes, des céphalées, des insomnies, des difficultés de concentration et des pertes de mémoire, des douleurs musculaires et articulaires, des sensations de brûlures dans la paume des mains et la plante des pieds, une dyspnée d'effort, des palpitations, des épistaxis, des saignements gingivaux, et hémoptysies modérées, une cyanose, un hippocratisme digital et une dilatation veineuse superficielle.<sup>135-140</sup> À un stade plus tardif de la maladie, une hypertension pulmonaire, un cœur pulmonaire chronique et des signes congestifs étaient observés.<sup>141,142</sup> Le mécanisme physiopathologique principal initialement proposé pour expliquer le CMS était alors une perte de l'acclimatation ventilatoire à l'altitude, conduisant à une hypoventilation centrale et à une hypoxémie sévère stimulant l'érythropoïèse.<sup>143</sup>

### 1.6.2 Aspects diagnostiques

Des critères diagnostiques précis ont fini par être proposés par les experts pour définir, à la fois, l'EE et le CMS. Actuellement, l'EE et le CMS sont définis selon les critères établis par la conférence de consensus de 2005 de l'*International Society for Mountain Medicine*.<sup>126</sup> Le CMS est ainsi défini comme « un syndrome clinique, se rencontrant chez des natifs ou des résidents de longue durée à une altitude supérieure à 2500 m, et caractérisé par une EE, une hypoxémie sévère, et dans certains cas une hypertension pulmonaire modérée ou sévère, pouvant évoluer vers un cœur pulmonaire et une insuffisance cardiaque congestive . Le tableau clinique de CMS disparaît progressivement lors de la descente à une altitude moins élevée et réapparaît lors d'un retour en haute altitude ». Par ailleurs, le diagnostic de CMS nécessite d'exclure la présence d'une pathologie chronique (pulmonaire ou extra-pulmonaire), susceptible d'aggraver l'hypoxémie, et donc d'être responsable d'une EE secondaire ; un diagnostic de CMS ne peut être porté chez les personnes vivant en dessous de 2500 m.<sup>126</sup>

En pratique, le score de CMS de Qinghai est utilisé, à la fois pour le diagnostic positif ou négatif de CMS, mais également pour quantifier sa sévérité en trois niveaux (absence de CMS : score  $\leq 5$  ; CMS léger : score entre 6 et 10 points ; CMS modéré : score entre 11 et 14 points ; CMS sévère : score  $\geq 15$  points). Ce score associe la notation de 0 (absence de symptôme) à 3 (symptôme sévère) de sept signes ou symptômes (essoufflement et/ou palpitations, troubles du sommeil, cyanose, dilatation veineuse, paresthésies, céphalées, acouphènes), à laquelle, 3 points sont ajoutés pour la présence d'une EE (tableau 2). L'EE est précisément définie comme une  $[Hb] \geq 21 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$  chez l'homme, et une  $[Hb] \geq 19 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$  chez la femme. Le seuil de  $21 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$  utilisé pour définir l'EE chez l'homme (et donc des valeurs anormalement hautes) correspond à la valeur moyenne plus deux fois l'écart-type de la  $[Hb]$  mesurée dans une population de jeunes hommes (20-30 ans), à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou).<sup>144,145</sup>

Il est à noter, que le consensus de 2005 ne précise pas explicitement que la présence d'une EE est un critère nécessaire et obligatoire pour porter le diagnostic de CMS ;<sup>126</sup> ainsi en pratique, dans certaines études s'intéressant au CMS, un diagnostic de CMS pouvait être considéré sur la base d'un score de CMS  $\geq 6$ , sans nécessairement qu'une EE soit présente (c'est-à-dire, en présence d'un score  $\geq 6$  en considérant uniquement les points liés aux symptômes et signes cliniques). Pour certains experts, il s'agit d'une interprétation erronée du consensus de 2005 et de la définition du CMS, tel qu'initialement décrit.<sup>146</sup> Par ailleurs, la somme des points accordés uniquement par la notation des signes ou des symptômes peut être présentée dans la littérature comme le « score clinique de CMS », reflétant alors uniquement la sévérité des manifestations cliniques présentées par le patient.

Avant ce consensus, d'autres scores clinico-biologiques similaires, mais basés sur des seuils de  $[Hb]$  ou d'hématocrite (Hct) légèrement différents et l'évaluation de plus nombreux symptômes ont été utilisés dans des études s'intéressant au CMS.<sup>135,145,147,148</sup> Par ailleurs, la plupart des études anciennes ne précisaient pas les critères précis de diagnostic du CMS ou de l'EE (parfois dénommée polyglobulie d'altitude) utilisés.<sup>138,139,141,142</sup> Cette hétérogénéité dans les définitions utilisées concernant le CMS et de l'EE peut en partie expliquer des conclusions parfois divergentes dans la littérature, en lien avec des populations d'étude différentes.

**Tableau 2 : Score de Qinghai utilisé pour le diagnostic de mal chronique des montagnes (*chronic mountain sickness*, CMS) et pour évaluer sa sévérité. D’après León-Velarde et coll.<sup>126</sup>**

Signe ou symptôme	Score
Essoufflement et/ou palpitations	0 Absence d’essoufflement et/ou palpitations 1 Essoufflement (et/ou palpitations) léger 2 Essoufflement (et/ou palpitations) modéré 3 Essoufflement (et/ou palpitations) sévère
Troubles du sommeil	0 Dort aussi bien que d’habitude 1 Ne dort pas aussi bien que d’habitude 2 Se réveille plusieurs fois, pauvre qualité de sommeil 3 Ne peut pas dormir du tout
Cyanose	0 Absence de cyanose 1 Cyanose légère 2 Cyanose modérée 3 Cyanose sévère
Dilatation des veines	0 Absence de dilatation veineuse 1 Dilatation veineuse légère 2 Dilatation veineuse modérée 3 Dilatation veineuse sévère
Paresthésies	0 Absence de paresthésies 1 Paresthésies légères 2 Paresthésies modérées 3 Paresthésies sévères
Céphalées	0 Absence de céphalées 1 Céphalées légères 2 Céphalées modérées 3 Céphalées sévères
Acouphènes	0 Absence d’acouphènes 1 Acouphènes légers 2 Acouphènes modérés 3 Acouphènes sévères
Concentration d’hémoglobine ([Hb])	Hommes : [Hb] < 21 g·dL <sup>-1</sup> ; score=0 [Hb] ≥ 21 g·dL <sup>-1</sup> ; score=3 Femmes : [Hb] < 19 g·dL <sup>-1</sup> ; score=0 [Hb] ≥ 19 g·dL <sup>-1</sup> ; score=3

La somme des points pour chaque symptôme ou signe clinique et des points donnés par la concentration d’hémoglobine constitue le score total du CMS (ou score de Qinghai). Le diagnostic de CMS est porté en présence d’un score de Qinghai ≥ 6 ; la sévérité du CMS est établie selon le score : CMS léger : score entre 6 et 10 ; CMS modéré : score entre 11 et 14 ; CMS sévère : score ≥ 15.

### 1.6.3 Physiopathologie

Les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'EE et au CMS restent encore imparfaitement compris. Les symptômes du CMS sont attribués à l'EE,<sup>137,146</sup> le lien de causalité étant justifié par la présence de symptômes chez des habitants de haute altitude présentant une polyglobulie et par l'amendement des symptômes lors de la réalisation de phlébotomies (avec ou sans compensation volémique).<sup>146</sup> Certains symptômes neurologiques non spécifiques du CMS (céphalées, acouphènes, paresthésies), pouvant correspondre à des manifestations d'hyperviscosité,<sup>149</sup> il est probable que les symptômes du CMS soient en partie expliqués par une hyperviscosité induite par l'augmentation de la [Hb]. L'hyperviscosité sanguine (ainsi que ses déterminants) des habitants de haute altitude souffrant d'EE ou de CMS a été peu étudiée.<sup>150,151</sup> Néanmoins, en analyse multivariée, une association significative était observée entre le score CMS et la viscosité sanguine à la Rinconada (5100 m, Pérou), dans une étude conduite au sein d'Expédition 5300, suggérant que l'augmentation de la viscosité sanguine pouvait contribuer à la symptomatologie du CMS.<sup>151</sup>

En l'absence de pathologie surajoutée, notamment respiratoire, susceptible de majorer l'hypoxémie, l'EE est principalement et historiquement attribuée à une stimulation accrue de l'érythropoïèse, en lien avec une « perte » ou une diminution de la RVH, conduisant à une hypoventilation relative et donc à une hypoxémie plus importante pour une altitude considérée.<sup>137,146</sup> Cette hypoventilation semble être plutôt d'origine centrale, en lien avec une diminution de la chémosensibilité au CO<sub>2</sub>, qu'en rapport avec une désensibilisation des chémorécepteurs périphériques à l'oxygène.<sup>143,152,153</sup> Ainsi, à un même niveau d'altitude, les habitants de haute altitude souffrant d'EE ou de CMS présentent le plus souvent des SpO<sub>2</sub> diurnes plus basses que ceux en bonne santé,<sup>147,154-156</sup> et il a été décrit une relation logarithmique inverse entre Hct et la ventilation par minute.<sup>137</sup> Une hypoxémie nocturne plus sévère est également observée chez les habitants de haute altitude souffrant d'EE ou de CMS.<sup>154,156-158</sup> Une majoration des événements apnéiques nocturnes (obstructifs ou centraux) est inconstamment retrouvée comme associée à l'EE ou au CMS dans la littérature ;<sup>154,157-159</sup> ainsi, pour certains, la sévérité de l'hypoxémie nocturne associée au CMS pourrait être uniquement la conséquence de l'hypoxémie diurne plus marquée chez ces habitants de haute altitude.<sup>154</sup> Une obésité ou un surpoids, fréquemment retrouvés associés au CMS, sont susceptibles de participer à une hypoventilation relative.<sup>137,146</sup>

Il a par ailleurs été suggéré que des événements in utero ou périnataux étaient susceptibles de contribuer à une réponse érythrocytaire inadaptée lors de la vie adulte en haute altitude (et ainsi d'augmenter la susceptibilité individuelle de développer un CMS), en influençant le développement pulmonaire et/ou le contrôle ventilatoire.<sup>160</sup> Ainsi, dans une étude conduite à La Paz (3600 m, Bolivie), la survenue d'un événement hypoxique néonatal ou l'occurrence d'une hypertension artérielle gravidique (ou d'une prééclampsie) pendant la grossesse étaient retrouvées dans des analyses multivariées, comme significativement associées à une EE, dans une population constituée de jeunes étudiants.<sup>161</sup>

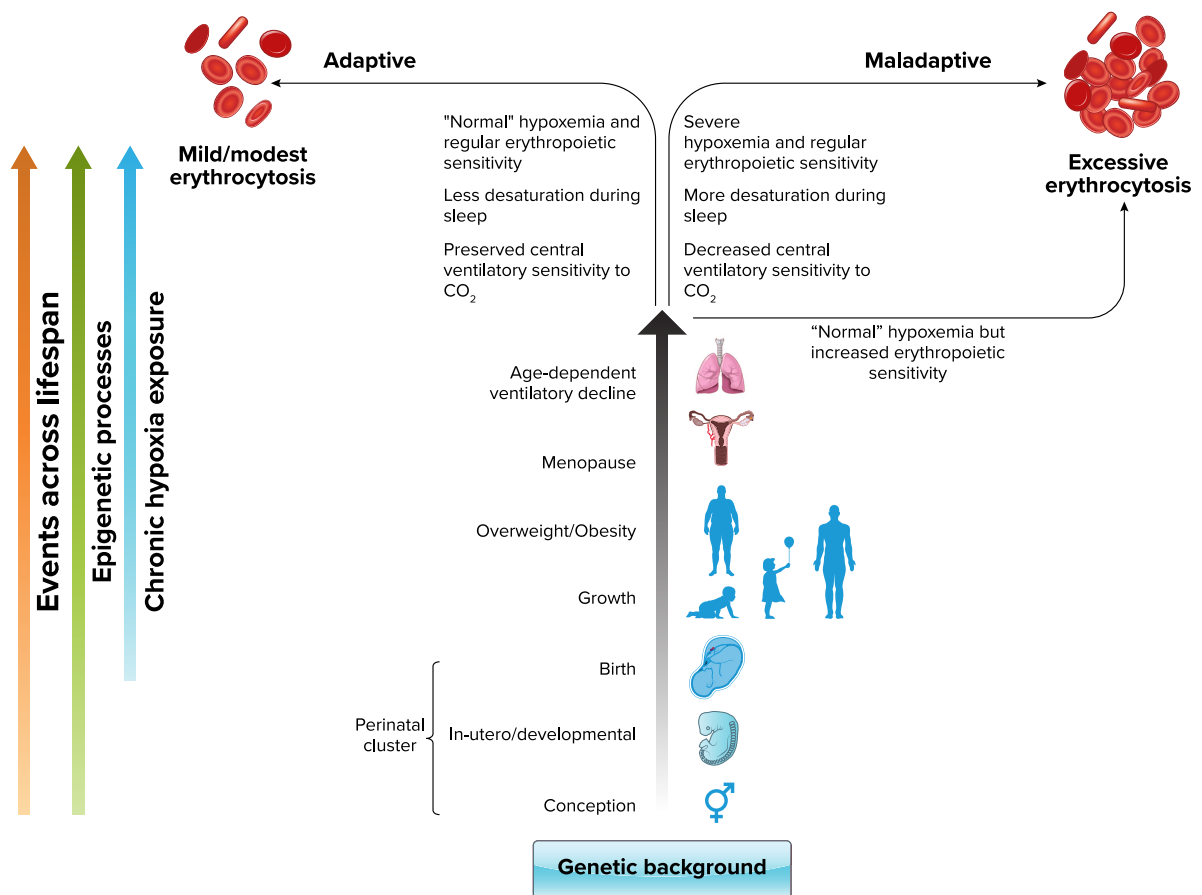
Devant une association inconstante entre les taux plasmatiques d'EPO, la SpO<sub>2</sub> et l'EE ou le CMS dans des populations andéennes, d'autres mécanismes ont été suggérés comme pouvant participer à la physiopathologie de ces conditions.<sup>137,146</sup> Ainsi, le rôle potentiel des récepteurs solubles à l'EPO (sEPOr) a été proposé, pour expliquer que certains habitants de haute altitude souffrant de CMS présentaient des taux plasmatiques d'EPO similaires aux habitants de haute altitude en bonne santé. Il a ainsi été mis en évidence, chez des patients CMS à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou), une diminution du taux plasmatique de sEPOr, conduisant à une augmentation de la disponibilité de l'EPO pour l'érythropoïèse et une association statistiquement significative entre le ratio EPO/sEPOr et la [Hb] ou la SpO<sub>2</sub>.<sup>162,163</sup>

Plus récemment, le rôle de certains gènes, ainsi que l'implication de processus épigénétiques, ont été soulignés dans l'expression de ce phénotype maladaptatif, particulièrement dans la population andéenne.<sup>146</sup> En effet, les populations tibétaines et éthiopiennes, présentant des mécanismes adaptatifs à l'hypoxie incluant une réponse érythropoïétique modérée, semblent ainsi génétiquement protégées contre l'EE et le CMS, à l'inverse des populations andéennes (qui présentent un phénotype adaptatif incluant une réponse érythropoïétique marquée).<sup>164</sup> En particulier, il a été mis en évidence une association entre un polymorphisme nucléotidique au niveau du gène codant pour la SENP1 (*sentrin-specific protease 1*) et le CMS chez les andéens.<sup>165,166</sup> SENP1 est une protéase permettant de réguler l'activité de facteurs transcriptionnels impliqués dans l'érythropoïèse, comme HIF- $\alpha$  et GATA-1, via un mécanisme de deSUMOylation.<sup>164</sup> Ainsi, en condition hypoxique in vitro, les cellules progénitrices érythropoïétiques dérivées de cellules souches pluripotentes (obtenues à partir de fibroblastes cutanés ou dérivées de la culture de cellules mononuclées du sang périphérique issues d'habitants de haute altitude souffrant de CMS), ont montré une importante

réponse proliférative par rapport aux cellules issues de sujets non CMS, associée, notamment, à une expression plus importante de SENP1 et GATA-1.<sup>167,168</sup>

Par ailleurs, il a été suggéré que les hormones féminines pouvaient jouer un rôle protecteur contre l'EE et le CMS, via un effet stimulateur sur la ventilation,<sup>169</sup> mais aussi potentiellement via un effet régulateur des œstrogènes sur l'érythropoïèse.<sup>170</sup>

Prises collectivement, ces données suggèrent que l'expression d'un phénotype maladaptatif à l'hypoxie chronique, c'est à dire le développement d'une EE et d'un CMS, est plurifactoriel, et associe à des prédispositions génétiques, des événements (potentiellement modifiables) survenant pendant la durée de vie passée en haute altitude (figure 8).



**Figure 8** : Facteurs aboutissant à l'expression d'une érythrocytose excessive, représentant un phénotype maladaptatif chez les résidents permanents de haute altitude soumis à une exposition hypoxique chronique. D'après Villafuerte et coll.<sup>146</sup>

#### 1.6.4 Prévalence et facteurs associés au CMS

Il est estimé de manière approximative et globale, que 5 à 10% de la population de haute altitude (c'est-à-dire vivant au-dessus de 2500 m) est à risque de développer un CMS.<sup>126</sup> De manière générale, la prévalence du CMS est plus élevée dans les Andes qu'en Himalaya, de manière concordante avec les différents phénotypes adaptatifs de ces populations, même s'il existe des grandes variations locales dans les études épidémiologiques, le plus souvent de faible effectif.<sup>171</sup> Par ailleurs, de manière également concordante avec une adaptation génétique protectrice concernant l'augmentation de la [Hb] chez les Tibétains, en Himalaya, le CMS est principalement rencontré dans la population Hans d'origine chinoise, plus récemment immigrée sur plateau tibétain. Ainsi, une prévalence du CMS de l'ordre de 1,2% a été rapportée chez les Tibétains, alors que celle rapportée dans la population Hans varie entre 5,6 et 17,8%.<sup>172,173</sup> Le CMS semble absent chez les Éthiopiens vivant en haute altitude même si les données restent limitées dans cette population.<sup>174</sup> Cette disparité de prévalence explique que la très grande majorité des études conduites sur le CMS aient été conduites dans les Andes, en particulier au Pérou, dans la ville minière de Cerro de Pasco (4300 m).

Ainsi, au Pérou, à Cerro de Pasco (4300 m), une prévalence de l'EE de l'ordre de 15,6% a été rapportée dans la population masculine,<sup>145</sup> alors qu'à Puno (3800 m), Ferrari et coll.<sup>155</sup> rapportaient une prévalence de l'EE de 4,5%. À la Rinconada (5100-5300 m), la prévalence de l'EE observée dans l'étude conduite par Hanco et coll.<sup>175</sup> était de 44%, alors que la prévalence du CMS n'était que de 14%, une prévalence donc superposable à celle rapportée à environ 4000 m par Villafuerte et coll.<sup>164</sup> Ainsi, la prévalence de l'EE augmente avec l'altitude de résidence (et donc avec la diminution de la  $P_B$ ) alors que la prévalence du CMS semble rester stable avec l'altitude, au moins au-dessus de 4000 m.

La prévalence de l'EE et du CMS augmente également avec l'âge,<sup>144,176-178</sup>, sans qu'il ne soit possible, en l'absence d'étude longitudinale, de savoir si cette association statistique est en lien avec le vieillissement en lui-même (et notamment en lien avec un déclin de la RVH avec l'âge) ou avec la durée de résidence en haute altitude. Ainsi, dans la série historique de Monge-C. et coll.<sup>144</sup>, si la prévalence observée de l'EE chez les hommes de 20-29 ans à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou) était de 6,8%, celle observée dans la tranche d'âge de 60-69 ans était de 33,7%. De manière constante, la prévalence de l'EE et du CMS apparaît plus élevée chez les hommes que

chez les femmes.<sup>137,155,171,173</sup> Ainsi, par exemple, à La Rinconada, si la prévalence observée de l'EE était de 47% chez les hommes, celle-ci était de 27% chez les femmes ; de la même manière, la prévalence du CMS chez les hommes était de 16% et chez les femmes de seulement 3,4%.<sup>175</sup>

En dehors de l'origine ethnique, de l'âge, du sexe et de l'altitude de résidence, d'autres facteurs ont été retrouvés comme significativement associés à l'EE et au CMS, dans des études conduites dans les Andes. Ainsi, un surpoids ou une obésité, un syndrome métabolique et une hypoxémie plus sévère pour un même niveau d'altitude sont des facteurs fréquemment retrouvés associés à l'EE et au CMS.<sup>137,155</sup>

Enfin, dans une petite étude cas-témoins conduite dans la ville minière de Cerro de Pasco (4300 m, Pérou), il était détecté la présence sanguine de cobalt uniquement dans le groupe de patients présentant un CMS (chez 52% d'entre eux), et non pas dans le groupe contrôle constitué d'habitants en bonne santé, avec une corrélation positive (et significative) entre le taux plasmatique de cobalt et l'Hct, suggérant qu'une intoxication chronique au cobalt pouvait participer au développement de l'EE.<sup>147</sup> À La Rinconada, ville également minière située au Pérou (5100-5300 m), nous n'avons pas retrouvé d'augmentation de la cobalturie, au-dessus des seuils retenus comme toxiques, chez la très grande majorité des mineurs, souffrant ou non de CMS (données Expédition 5300, non publiées).

## **1.6.5 Impact de l'EE et du CMS sur l'organisme et morbi-mortalité**

### **1.6.5.1 Impact hématologique, martial et sur les volumes intravasculaires**

Dans des études historiques, s'intéressant à la polyglobulie d'altitude ou au CMS (sans définitions standardisées) et conduites au Pérou à Morococha (4500 m) ou à Cerro de Pasco (4300 m), il était observé que l'augmentation de la [Hb], chez les sujets considérés comme malades, était associée à une augmentation du RBCV, une augmentation du BV, mais également à une diminution du PV, en comparaison aux habitants de haute altitude en bonne santé et aux habitants de plaine.<sup>138,179-182</sup> L'augmentation de la [Hb] ne s'accompagnait pas d'une hyperleucocytose. De plus, sur des myélogrammes réalisés dans une étude ancienne s'intéressant à la polyglobulie d'altitude, l'hyperplasie observée de la lignée érythroblastique

ne s'accompagnait pas d'anomalie des autres lignées.<sup>183</sup> Enfin, la durée de vie moyenne des globules rouges des habitants de haute altitude polyglobuliques semblait normale (114 jours) dans une étude où la [Hb] (ou l'Hct) des participants n'était malheureusement pas précisée.<sup>184</sup>

Quelques études plus récentes se sont attachées à mesurer les volumes intravasculaires chez les habitants de haute altitude présentant un CMS, en utilisant, soit une mesure directe du PV par la méthode de dilution du bleu d'Evans (et un calcul du BV et du RBCV à partir de l'Hct),<sup>185</sup> soit en utilisant une mesure directe de l'Hb<sub>mass</sub> par la technique de ré-inhalation au monoxyde de carbone (*CO rebreathing*), à partir de laquelle les valeurs de PV, RBCV et BV peuvent être calculées en utilisant la valeur de la [Hb] et de l'Hct.<sup>186-188</sup>

Ainsi, en 2004, à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou), Claydon et coll.,<sup>185</sup> dans une étude s'intéressant à la tolérance orthostatique des habitants de haute altitude, n'observaient pas de différence de PV entre ceux présentant un CMS et ceux n'en présentant pas ; les patients souffrant de CMS, présentaient par ailleurs une augmentation significative de leur RBCV et de leur BV, par rapport aux habitants de haute altitude en bonne santé. Néanmoins, dans cette étude, de faible effectif (11 participants dans chaque groupe), la définition du CMS était basée uniquement sur un Hct > 60% et ne correspondait donc pas à celle retenue actuellement.

Des études plus récentes, utilisant la définition de 2005 du CMS,<sup>126</sup> suggèrent, au contraire, qu'une diminution du PV (en association avec l'augmentation du RBCV), contribue à l'augmentation de la [Hb], chez les patients présentant un CMS.<sup>186-188</sup> Steele et coll.<sup>187</sup> retrouvaient ainsi, à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou), un RBCV significativement augmenté et un PV significativement plus faible chez les CMS, en comparaison aux non CMS, alors que le BV était similaire entre les deux groupes. Cette contraction du volume plasmatique chez les CMS était associée à une activité moindre du SRAA, en comparaison aux non CMS. La contribution d'une diminution du PV à l'augmentation de la [Hb] dans le CMS (en association avec l'augmentation de l'Hb<sub>mass</sub>), a également été soulignée dans une étude conduite à La Paz (3600 m, Bolivie), récemment publiée.<sup>186</sup>

Enfin, une étude transversale conduite au Pérou entre Lima (0 m), Puno (3800 m) et La Rinconada (5100-5300 m), dans le cadre d'Expédition 5300, a apporté des éléments originaux concernant les volumes intravasculaires des habitants de haute altitude.<sup>188</sup> Dans cette étude, chez les participants ne présentant pas de CMS, l'augmentation de la [Hb] avec l'altitude de résidence se traduisait par une augmentation progressive de l'Hb<sub>mass</sub>, du RBCV et du BV et par une diminution du PV. De manière intéressante, à La Rinconada (5100-5300 m), le groupe de participants souffrant de CMS présentait des valeurs de [Hb], d'Hb<sub>mass</sub> et de RBCV similaires

aux valeurs observées dans le groupe de participants ne présentant pas de CMS ; cependant il était observé une tendance à un plus faible PV chez les individus symptomatiques (c'est-à-dire présentant un CMS) en comparaison aux individus asymptomatiques (ne présentant pas de CMS). Il était ainsi suggéré qu'une diminution du PV chez les CMS participait potentiellement à une augmentation de la viscosité sanguine et donc à la symptomatologie.<sup>188</sup> Dans notre expérience à La Rinconada (donnée non publiée), la masse d'hémoglobine la plus importante mesurée chez un habitant présentant un CMS modéré (score de Qinghai à 8) était de 2948 grammes ( $38,8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), et s'accompagnait d'un BV de 11748 mL ( $154,6 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

Comme nous l'avons précédemment souligné, l'hyperviscosité sanguine (ainsi que ses déterminants) induite par l'EE a été peu étudiée.<sup>150,151</sup> Dans l'étude conduite par Stauffer et coll.<sup>151</sup> à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou), la viscosité sanguine augmentait avec l'altitude de résidence, chez les participants ne présentant pas de CMS, entre le niveau de la mer, 3800 m et 5100 m, quel que soit le taux de cisaillement. À 5100 m, les participants présentant les CMS les plus sévères (et les [Hb] les plus hautes) présentaient une viscosité significativement plus élevée que les participants sans CMS, uniquement à taux de cisaillement élevé et également après correction de l'Hct à 40% (par hémodilution en utilisant du plasma autologue) ; ces données suggéraient que d'autres facteurs (en dehors de la seule augmentation de la [Hb]), tel qu'une moindre déformabilité des globules rouges, pourraient jouer un rôle dans l'augmentation de la viscosité sanguine chez les CMS les plus sévères.<sup>151</sup>

Si dans les études historiques, il était observé des taux de plaquettes similaires entre les habitants de haute altitude en bonne santé et ceux souffrant de CMS ou de polyglobulie d'altitude,<sup>179-182</sup> des données plus récentes, majoritairement issues d'études chinoises conduites sur le plateau tibétain dans des populations d'origine Hans, mettent en évidence une diminution du taux de plaquettes et une augmentation du volume plaquettaire moyen chez les habitants de haute altitude souffrant d'EE, en comparaison à ceux en bonne santé.<sup>189</sup> Cette thrombocytopénie semble être d'origine périphérique, comme le suggère l'augmentation du volume plaquettaire moyen. Ainsi, une étude récente retrouvait une apoptose plaquettaire plus importante, en lien avec une activation plaquettaire marquée, chez des patients présentant une EE.<sup>190</sup> Néanmoins, aucune étude similaire n'a été menée dans la population andéenne et la transposition de ces résultats aux Andéens souffrant d'EE ou de CMS reste sujette à caution.

Enfin, peu de données ont été publiées concernant le statut martial des habitants de haute altitude souffrant d'EE ou de CMS. Dans une étude conduite à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou), De Ferrari et coll.<sup>155</sup> n'observaient pas de différence en termes de bilan martial conventionnel (ferritine, saturation de la transferrine, fer sérique), entre les participants présentant une EE et ceux ne présentant pas d'EE. Des résultats similaires étaient rapportés par Villafuerte et coll.<sup>162</sup> entre patients présentant un CMS, habitants de haute altitude en bonne santé et résidents de plaine à la même altitude.

À notre connaissance, l'axe EPO-ERFE-hepcidine a peu été investigué chez les habitants de haute altitude présentant un CMS. Dans une étude conduite chez 11 patients CMS à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou), Talbot et coll.<sup>191</sup> ont mesuré des taux plasmatiques basaux d'hepcidine similaires à ceux mesurés chez des habitants de plaine suggérant ainsi l'existence d'un état de stabilité malgré une activité érythropoïétique élevée. La réalisation d'une hémodilution isovolémique progressive sur quatre jours, conduisant à une diminution de l'Hct de l'ordre de 20%, s'accompagnait rapidement d'une augmentation du taux plasmatique d'EPO, d'un effondrement du taux plasmatique d'hepcidine sur la mesure réalisée à J4, puis dans un second temps d'une diminution de la ferritine et du coefficient de saturation de la transferrine à partir de J12, puis d'une augmentation du sTfR à J19 ; à noter, dans cette étude, il n'était pas observé dans les 15 jours suivant les phlébotomies de variation du taux d'ERFE (dénommée par le nom de son gène FAM132B).

### **1.6.5.2 Impact sur le système cardio-vasculaire**

Les habitants de haute altitude souffrant de CMS présentent habituellement une pression artérielle pulmonaire plus élevée que ceux ne présentant pas de CMS.<sup>192,193</sup> Cependant, au repos, cette élévation semble modeste, comme soulignée dans une méta-analyse récente, retrouvant une PAPs moyenne à 28 mmHg [intervalle de confiance à 95% : 26-30 mmHg] chez des patients CMS,<sup>194</sup> correspondant à environ +11% de la valeur observée chez des habitants de haute altitude sans CMS.<sup>128</sup> Une analyse en méta-régression retrouvait une association significative entre l'augmentation de la PAPs et l'altitude, ainsi qu'avec la diminution de la SpO<sub>2</sub> et l'augmentation de la [Hb].<sup>194</sup> La vascularisation pulmonaire des patients CMS semble rester sensible à l'effet vasodilatateur du monoxyde d'azote inhalé.<sup>195</sup>

À l'exercice, avec l'augmentation du DC, l'augmentation de la pression artérielle pulmonaire est par contre particulièrement marquée chez les patients CMS, en comparaison aux non CMS, même pour des exercices de faible intensité (50 watts), correspondant à un niveau d'exercice de la vie quotidienne.<sup>192,194,195</sup> Une moindre distensibilité du réseau vasculaire pulmonaire (en

lien avec un remodelage vasculaire plus marqué) explique probablement en partie cette hypertension pulmonaire à l'exercice chez les patients CMS.<sup>195,196</sup> Par ailleurs, l'augmentation de la viscosité sanguine induite par l'augmentation de l'Hct participe également à l'hypertension pulmonaire chez les patients CMS. Ainsi, lorsque les valeurs des RVP sont corrigées à l'Hct (normalisation à 45%), la différence entre patients CMS et non CMS s'amenuise ou disparaît, suggérant le rôle d'un Hct élevé dans l'augmentation de la pression artérielle pulmonaire ; de manière concordante, une hémodilution isovolémique était associée chez des patients CMS à une diminution des pressions pulmonaires et à une augmentation du DC dans des observations anciennes.<sup>196,197</sup>

Cependant, dans une étude randomisée en double aveugle, s'intéressant à l'effet d'une déplétion, puis d'une supplémentation martiale, chez des patients souffrant de CMS à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou), une hémodilution isovolémique conduite sur plusieurs jours et conduisant à une réduction de l'Hct d'environ 20%, s'accompagnait de l'apparition d'une carence martiale et d'une augmentation de la PAPs d'environ 25%, sans qu'une administration intraveineuse de fer (versus placebo) n'induisse une diminution significative de la PAPs par la suite.<sup>57</sup> Cette étude n'a néanmoins jamais été reproduite. L'effet d'une supplémentation intraveineuse de fer sur la PAPs (au repos et à l'exercice) de patients andéens CMS (sans déplétion martiale préalable) n'a par ailleurs jamais été investiguée ; la vascularisation pulmonaire des patients CMS étant ainsi jugée, pour certains, non répondeuse à l'administration de fer, sur la base de cette unique étude.<sup>54</sup>

Sur un plan morphologique, cette augmentation de la pression artérielle pulmonaire chez les habitants de haute altitude présentant un CMS est associée à un remodelage des cavités cardiaques droites sous la forme d'une dilatation de celles-ci, sans altération de la fonction contractile.<sup>192,193,197</sup> Cette dilatation des cavités droites est également corrélée à l'augmentation du BV (induite par l'augmentation du RBCV).<sup>197</sup> À La Rinconada (5100-5300 m, Pérou), la dilatation des cavités droites s'accompagne d'un remodelage concentrique du ventricule gauche, plus marqué chez les habitants CMS.<sup>197</sup>

Le CMS est donc susceptible de participer au développement d'une hypertension pulmonaire, pouvant évoluer vers un cœur pulmonaire chronique et une insuffisance cardiaque droite congestive, tel qu'historiquement décrit dans les années 1970.<sup>124,141,142</sup> Néanmoins, il est suggéré que l'évolution du CMS vers une défaillance ventriculaire droite reste peu fréquente, même si la fréquence de l'association entre CMS et cœur pulmonaire chronique reste

inconnue.<sup>196</sup> Il est à noter que, selon le consensus de 2005, la définition de l'HAPH exclue la présence d'une EE ; il n'est donc à priori pas possible, sur le plan sémantique, de parler d'HAPH chez un patient présentant à la fois un CMS et une hypertension pulmonaire répondant aux critères de PAPm ou PAPs définissant l'HAPH.<sup>126</sup>

Sur le plan vasculaire, une altération de la fonction endothéliale, évaluée par une mesure échographique de la vasodilatation induite par le flux (*flow-mediated vasodilatation*, FMD), a été observée chez des Andéens présentant une EE ou un CMS, en comparaison à des Andéens en bonne santé, dans des études conduites à La Paz (3600 m, Bolivie) et à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou).<sup>150,198,199</sup> Dans ces études, une réduction de la viscosité sanguine induite par une hémodilution isovolémique ou l'administration d'oxygène, s'accompagnait d'une amélioration de la FMD.<sup>150,198</sup> L'altération de la fonction endothéliale chez les Andéens présentant un CMS était également associée à une augmentation du stress oxydatif et nitrosatif limitant la biodisponibilité du monoxyde d'azote.<sup>199</sup> De manière générale, une altération de la fonction endothéliale est impliquée dans le développement de l'athérosclérose et est associée au risque de maladie cardio-vasculaire.<sup>200</sup>

Enfin, dans une étude conduite à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou),<sup>201</sup> le risque cardio-vasculaire (évalué à l'aide du score de Framingham) était retrouvé comme majoré chez les habitants de haute altitude présentant une EE ; la présence d'une EE était associée à une prévalence plus importante de facteurs de risque cardio-vasculaire dans cette population (hypertension artérielle, diabète ou intolérance au glucose, dyslipidémie...), association également mise en évidence dans d'autres études.<sup>137,155,202</sup> Si l'EE a été retrouvée associée à une hypertension artérielle à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou), lors de mesures ambulatoires réalisées sur 24 heures,<sup>203</sup> à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou), il n'était pas retrouvé de pressions artérielles significativement plus élevées chez les habitants souffrant de CMS, en comparaison avec ceux en bonne santé ; la seule différence observée était une variabilité de la pression artérielle nocturne (systolique et diastolique) significativement plus importante chez les participants présentant un CMS modéré à sévère, en comparaison avec les participants en bonne santé et ceux présentant un CMS léger.<sup>154</sup>

Prises collectivement, ces données suggèrent donc une élévation du risque de pathologie cardio-vasculaire, d'hypertension pulmonaire et d'insuffisance cardiaque droite, chez les habitants de haute altitude présentant une EE ou un CMS, sans que de solides données

épidémiologiques ne permettent d'en préciser les prévalences, ni l'évolution au cours du temps du remodelage cardiaque, en l'absence d'études longitudinales.<sup>197</sup>

#### **1.6.5.3 Impact sur le système respiratoire**

Par définition, les patients souffrant de CMS ne présentent pas de maladie respiratoire associée, susceptible de participer à l'aggravation des échanges gazeux.<sup>126</sup> De manière intéressante, il a été proposé que l'EE, en elle-même, était susceptible d'impacter les échanges gazeux en altérant le rapport ventilation/perfusion pulmonaire et qu'une diminution de l'Hct était susceptible d'améliorer l'hypoxémie.<sup>204,205</sup>

#### **1.6.5.4 Impact rénal**

Malgré un débit rénal plasmatique diminué, le débit de filtration glomérulaire est préservé chez les habitants de haute altitude présentant une EE ou un CMS, du fait d'une augmentation de la fraction de filtration rénale.<sup>206,207</sup> Une micro-albuminurie ou une protéinurie ainsi qu'une hyperuricémie ont également été rapportées associées à l'EE ou au CMS.<sup>187,208</sup> Ces observations ont fait proposer, pour certains, l'existence d'un « syndrome rénal de haute altitude », associant, polyglobulie, hypertension artérielle, hyperuricémie et microalbuminurie, dont la physiopathologie serait multifactorielle (hypoxie tissulaire, hypertrophie capillaire glomérulaire, hyperviscosité sanguine...)<sup>207</sup> Dans une étude histologique rétrospective conduite sur des biopsies rénales réalisées sur des habitants de haute altitude d'origine chinoise vivant sur le plateau tibétain, des lésions rénales glomérulaires associant hypertrophie glomérulaire, effacement des pieds des podocytes, épaissement de la membrane basale et sclérose glomérulaire ont été mis en évidence chez des patients présentant une EE ; ces lésions glomérulaires s'accompagnaient également d'un remaniement vasculaire extra-glomérulaire artériolaire.<sup>209</sup> Les auteurs de cette étude proposaient un schéma physiopathologique pour expliquer ces lésions, et suggéraient, qu'à la fois, l'hypoxie chronique en elle-même et les modifications hémorhéologiques induites par l'EE, contribuaient au développement d'une maladie rénale associée à l'EE.<sup>209</sup>

#### **1.6.5.5 Impact neurocognitif**

Le CMS est associé avec de nombreux symptômes neuropsychologiques (céphalées, vertiges, paresthésies, acouphènes, somnolence, fatigue, difficultés de concentration, troubles

de l'humeur...) dont certains sont d'ailleurs inclus dans le score CMS de Qinghai (tableau 2).<sup>135,137</sup>

Par ailleurs, une altération des performances cognitives ainsi qu'une majoration de l'intensité de symptômes de dépression ont été mis en évidence chez les habitants de haute altitude souffrant d'EE ou de CMS.<sup>210,211</sup> De manière concordante, des études récentes d'imagerie cérébrale, toutes conduites par le même groupe dans la province chinoise de Qinghai, retrouvaient des anomalies cérébrales structurales (atrophie cortico-sous-corticale, foyers ischémiques et hémorragiques multiples, modifications quantitatives de la substance blanche et grise, œdème cérébral...) et fonctionnelles, chez les patients souffrant de CMS, en comparaison à des habitants de haute altitude en bonne santé.<sup>212-214</sup>

Dans une étude conduite à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou), il n'avait pas été retrouvé de différences en termes de performance cognitive en utilisant le test du MoCA (*Montreal Cognitive Assessment*), en fonction du statut CMS des participants ; cependant les participants en bonne santé vivant à La Rinconada présentaient un score MoCA significativement plus faible que les participants vivant à Puno (3800 m) ou à Lima (0 m), en faveur d'une légère détérioration cognitive, en comparaison à des scores normaux à plus basse altitude.<sup>154</sup> Dans cette même étude, des résultats similaires étaient observés concernant la qualité de vie (évaluée à l'aide du questionnaire SF-36), avec une qualité de vie significativement moins bonne à La Rinconada, en comparaison à celle évaluée à plus basse altitude, et sans différence significative en fonction du statut CMS à La Rinconada. Ces résultats contrastent donc avec ceux précédemment observés concernant l'association entre CMS et diminution des performances cognitives et augmentation de l'intensité d'une symptomatologie dépressive, dans une étude, néanmoins conduite à plus basse altitude (La Paz, 3600 m, Pérou).<sup>210</sup> Ainsi, à La Rinconada, l'impact de l'hypoxie chronique (et de l'environnement) sur la cognition et la qualité de vie semble s'exercer de manière similaire chez les habitants avec ou sans CMS, à l'inverse de ce qui a été décrit à plus basse altitude.<sup>210</sup> Néanmoins, une évaluation plus fine des fonctions cognitives reste à être menée dans cette population vivant de manière permanente à plus de 5000 m d'altitude.

#### **1.6.5.6 Impact sur le système hémostatique**

L'impact d'une exposition hypoxique aiguë des habitants de plaine sur le système hémostatique (et en particulier sur la coagulation) a été particulièrement investigué et les études récentes ne confirment pas la croyance d'un effet pro-coagulant induit par l'hypoxie.<sup>215</sup> À l'inverse, le profil hémostatique des habitants de haute altitude reste peu investigué, en

particulier, chez ceux présentant une EE ou un CMS, pour lesquels, les interactions entre globules rouges et les différents composants du système hémostatique (endothélium, plaquettes, facteurs de la coagulation) pourraient favoriser la survenue de thromboses artérielles et veineuses.<sup>216</sup> Malgré des hypothèses avancées concernant le risque de thrombose chez les habitants de haute altitude souffrant de CMS,<sup>146,217</sup> aucune étude épidémiologique ne soutient réellement l'hypothèse d'un risque thrombotique accru dans cette population. Les études physiologiques s'intéressant à l'exploration de l'hémostase dans un contexte de CMS ou d'EE sont rares et retrouvent des résultats potentiellement divergents.<sup>218,219</sup> Dans une étude conduite à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou), DeSouza et coll.<sup>218</sup> n'observaient pas de profil hypercoagulable ou d'anomalie de la fibrinolyse chez des habitants de haute altitude présentant une EE. Inversement, à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou), dans une étude préliminaire, il était observé un temps de coagulation et un temps de saignement significativement plus courts chez des habitants de haute altitude présentant une EE, versus ceux ne présentant pas d'EE.<sup>219</sup> Les données concernant l'hémostase primaire et la fonction plaquettaire sont également rares. Comme nous l'avons souligné précédemment, il a récemment été suggéré, dans une étude conduite sur le plateau tibétain, que l'EE était associée à une plus grande activation plaquettaire, conduisant à une apoptose plaquettaire et expliquant ainsi la thrombopénie retrouvée comme associée à l'EE.<sup>189,190</sup> La pertinence clinique de ces résultats en termes de surrisque thrombotique ou hémorragique ainsi que la transposition de ces résultats à d'autres populations de haute altitude restent à éclaircir.

Des études s'intéressant donc à l'impact de l'EE sur l'hémostase restent donc à conduire. Étant donné l'interaction importante des globules rouges avec les facteurs de la coagulation et les plaquettes,<sup>216</sup> l'étude de la formation du caillot sur sang total en utilisant des techniques viscoélastiques (comme la thromboélastométrie)<sup>220</sup> pourrait être informative pour préciser si les habitants de haute altitude souffrant d'EE ou de CMS présentent ou non un profil pro-coagulant, en comparaison aux habitants de haute altitude en bonne santé ou aux habitants de plaine.

#### **1.6.5.7 Capacité à l'exercice**

De manière contre-intuitive, malgré l'hyperviscosité associée à l'EE et l'existence d'une augmentation importante de la pression artérielle pulmonaire à l'effort pouvant intuitivement limiter l'augmentation du DC à l'effort et participer à une limitation des apports tissulaires en oxygène à l'exercice, les habitants de haute altitude souffrant d'EE ou de CMS semblent avoir une capacité à l'exercice préservée. Ainsi, dans une étude conduite à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou), Groepenhoff et coll.<sup>221</sup> observaient une  $\dot{V}O_2$  max similaire entre habitants de haute

altitude souffrant d'EE ou de CMS, ceux en bonne santé, et habitants de plaine exposés de manière aiguë en altitude. Un résultat similaire était également observé dans deux études plus récemment conduites à la même altitude.<sup>222,223</sup> Ainsi, si les individus présentant une EE ou un CMS semblaient présenter un DC maximal plus faible à l'effort, une hypertension pulmonaire plus marquée et une moins bonne efficacité ventilatoire à l'exercice, ces limitations sont potentiellement compensées par un  $\text{CaO}_2$  augmenté et par une meilleure diffusion pulmonaire et musculaire.<sup>221,223</sup>

#### **1.6.5.8 Morbi-mortalité**

Nous l'avons vu, l'EE ou le CMS semblent impacter un certain nombre de grandes fonctions physiologiques. L'EE et le CMS sont fréquemment proposés comme associés à une morbidité cardio-vasculaire et cérébro-vasculaire et donc à une potentielle surmortalité.<sup>217</sup> Si cette morbidité paraît évidente, du fait de l'impact propre de l'EE ou du CMS sur le système cardio-vasculaire et des facteurs de risque cardio-vasculaire très souvent associés chez ces patients, il n'existe pas à ce jour, à notre connaissance, d'études épidémiologiques s'intéressant à évaluer spécifiquement la morbi-mortalité attribuable à l'EE et au CMS dans les populations de haute altitude.

#### **1.6.6 Traitement du CMS**

Le traitement le plus simple de l'EE ou du CMS pourrait consister en une relocalisation à plus basse altitude. Dans des observations anciennes, portant sur de faibles effectifs, une descente au niveau de la mer s'accompagnait d'une amélioration rapide de l'hypoxémie, associée, en quelques semaines, à une nette diminution de la [Hb] et de la pression artérielle pulmonaire.<sup>138,141,224</sup> Une étude plus récente, incluant un faible effectif (n=9) d'habitants de Cerro de Pasco (4300 m, Pérou), présentant une polyglobulie ([Hb] comprise entre 20,3 et 26,2  $\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ ), permettait d'observer une diminution rapide du RBCV (-7%) dans les premiers jours suivant l'arrivée au niveau de la mer, précédant la décroissance du taux de réticulocytes, suggérant ainsi qu'un mécanisme de néocytolyse était à l'origine de la réduction de la [Hb].<sup>225</sup> Des études complémentaires bien conduites avec de plus grands effectifs semblent nécessaires pour préciser la cinétique (et le mécanisme) de décroissance de la [Hb] (et de la pression artérielle pulmonaire) lors de la descente à plus basse altitude des patients présentant une EE ou un CMS.

Néanmoins, en pratique, pour des raisons sociales ou économiques, la délocalisation permanente au niveau de la mer de ces patients est rarement possible.<sup>137,196</sup> Dans notre expérience à La Rinconada (5100-5300 m), les habitants présentant un CMS impactant leur qualité de vie alternent, dans la mesure du possible, des séjours à plus basse altitude à Juliaca ou Puno (3800 m), avec leur résidence pour motif économique à La Rinconada.

Ainsi, partant du principe que la symptomatologie du CMS est attribuée à l'EE, plusieurs thérapeutiques (médicamenteuses ou non médicamenteuses) ont alors été proposées afin de réduire la [Hb].<sup>226</sup>

### **1.6.6.1 Traitements non médicamenteux**

#### **1.6.6.1.1 Phlébotomie**

La réalisation de saignées, avec ou sans compensation volémique (hémodilution isovolémique), est associée à une réduction de la [Hb] (et de l'Hct) et à une amélioration des symptômes chez les patients présentant un CMS.<sup>137,226</sup> Par ailleurs, dans des études physiologiques anciennes et de faible effectif, la réalisation d'une saignée, avec ou sans compensation volémique, s'accompagnait d'une diminution de la pression artérielle pulmonaire, d'une augmentation du DC, ainsi que d'une amélioration de l'oxygénation (probablement en raison d'une amélioration du rapport ventilation-perfusion).<sup>204,205,227</sup> Néanmoins, la réalisation d'une hémodilution isovolémique ne s'accompagne pas d'une amélioration de la capacité aérobie chez des habitants de haute altitude souffrant d'EE.<sup>223</sup> Si la réalisation de phlébotomies paraît efficace pour rapidement améliorer les symptômes du CMS et diminuer la [Hb], en l'absence de relocalisation à plus basse altitude, ces effets ne sont que transitoires. Un effet rebond est classiquement décrit par les experts dans les semaines suivantes, avec une re-ascension de la [Hb] au-dessus de la valeur pré-phlébotomie, associée à une récurrence des symptômes.<sup>137</sup> Néanmoins, il n'existe pas, à notre connaissance, d'études longitudinales publiées à ce jour, s'intéressant au suivi hématologique de patients souffrant de CMS et bénéficiant de phlébotomies répétées. Par ailleurs, la réalisation d'une hémodilution isovolémique est susceptible d'entraîner des effets délétères chez les patients CMS ; ainsi, dans une étude conduite à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou), celle-ci s'accompagnait dans les jours suivants, d'une carence martiale et d'une augmentation concomitante de la PAPs, sans qu'une

supplémentation martiale intra-veineuse ne s'accompagne par la suite d'une diminution de la PAPs.<sup>57</sup>

Enfin, de manière anecdotique, la réalisation de séances d'érythraphérèse thérapeutique a également été décrite chez des patients CMS sur le plateau tibétain mais l'accessibilité à cette technique paraît limitée, du fait de considérations médico-économiques, dans les régions particulièrement touchées par le CMS comme dans les Andes.<sup>228,229</sup>

#### **1.6.6.1.2 Exercice physique**

La pratique régulière d'une activité sportive pourrait avoir un effet bénéfique sur la [Hb] et les symptômes du CMS. Ainsi, dans une étude de faible effectif incluant 8 patients souffrant de CMS, sans groupe contrôle, conduite à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou), Macarlupú et coll.<sup>230</sup> rapportaient une diminution significative de l'Hct (7% en moyenne), associée à une diminution significative du score CMS de Qinghai (~40%), après un programme d'entraînement aérobie de 8 semaines sur cyclo-ergomètre (une heure par jour, quatre jours par semaine à 60% du  $\dot{V}O_2$  pic). Dans cette étude, l'absence de mesure des variations des volumes intravasculaires ne permettait pas d'apprécier les mécanismes sous-jacents à cette diminution de l'Hct ; cependant, en l'absence d'argument indirect en faveur d'une hémolyse et devant l'absence de modification significative du taux plasmatique d'EPO, il était postulé par les auteurs que la diminution observée de l'Hct était la conséquence d'une augmentation du PV induite par l'exercice, plutôt qu'une diminution du RBCV.

#### **1.6.6.2 Traitements médicamenteux**

Devant les effets bénéfiques transitoires et les effets potentiellement délétères des phlébotomies, qui plus est, souvent mal acceptées par les habitants de haute altitude dans les Andes, des traitements médicamenteux ont été proposés avec pour objectif de diminuer la [Hb], en partant du principe que celle-ci s'accompagnera d'une amélioration de la symptomatologie du CMS.<sup>226</sup> Les patients touchés par le CMS étant le plus souvent issus de régions pauvres et isolées, par ailleurs peu fournies en ressources médicales, le traitement médicamenteux idéal devrait être facile à administrer en ambulatoire, peu coûteux et dépourvu d'effets indésirables majeurs ou susceptibles de compromettre l'observance. Avant que l'ACZ ne soit considéré comme une molécule prometteuse pour le traitement du CMS, plusieurs molécules ont été testées dans cette indication.

### 1.6.6.2.1 L'aire pré-acétazolamide

Une hypoventilation relative participant à la physiopathologie de l'EE, l'utilisation de stimulants ventilatoires a été proposée pour le traitement du CMS. Ainsi, l'utilisation prolongée (10 semaines) d'agents progestatifs (médroxyprogestérone) a été par exemple testée chez 17 hommes polyglobuliques résidents à Leadville (3100 m, Colorado, USA), à la fin des années 70, dans une étude non contrôlée.<sup>231</sup> Ce traitement hormonal s'était montré efficace pour majorer la ventilation, améliorer l'oxygénation et diminuer significativement l'Hct de 8% en moyenne ; cependant, l'effet indésirable hormonal observé dans cette étude (diminution de la libido) rend difficile l'utilisation de ce traitement en pratique courante sur le long terme.<sup>231</sup> De la même manière, l'utilisation de l'almitrine (un agoniste des chémorécepteurs périphériques) a également été évaluée chez des patients présentant une polyglobulie d'altitude dans une étude randomisée contre placebo (ancienne et de faible effectif), dans laquelle les patients traités par almitrine présentaient une faible, mais significative, diminution de l'Hct (-3,5%), après 4 semaines de traitement.<sup>232</sup> Il est à noter que l'almitrine par voie orale a fait l'objet d'un retrait d'autorisation de mise sur le marché des médicaments en 2013 par l'Agence européenne du médicament en raison d'effets indésirables graves (perte de poids importante, neuropathies périphériques non réversibles à l'arrêt du traitement) et d'un rapport bénéfice / risque défavorable.

L'utilisation de médicaments de la classe des méthylxanthines, en particulier la pentoxifylline, a également été suggérée pour le traitement du CMS.<sup>226</sup> En effet, du fait d'un potentiel effet inhibiteur sur la sécrétion rénale d'EPO et d'un effet réducteur de la viscosité sanguine, la pentoxifylline pourrait présenter un intérêt chez les patients CMS. Cependant, à notre connaissance, aucune étude clinique n'a été publiée à ce jour.

Enfin, par analogie avec l'effet observé des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC) dans les polyglobulies secondaires après transplantation rénale, et en tenant compte de l'association fréquente de la polyglobulie d'altitude avec une protéinurie, l'utilisation d'IEC a été proposée dans le traitement de la polyglobulie d'altitude. Ainsi, dans une étude conduite sur deux ans à La Paz (3600 m, Bolivie), l'administration d'un traitement par énalapril, chez des patients présentant une polyglobulie d'altitude (définie comme un Hct  $\geq$  55%) et une protéinurie isolée ( $\geq$  150 mg/24h), s'était montrée efficace pour diminuer à la fois le débit de la protéinurie et la [Hb] de manière significative.<sup>233</sup> Néanmoins, cette étude

randomisée, en ouvert, n'a jamais été reproduite, en particulier dans une population de patients souffrant d'EE ou de CMS tels que définis par le consensus de 2005.<sup>126</sup>

### **1.6.6.2.2 L'acétazolamide : un traitement promoteur**

L'ACZ, couramment utilisé pour la prévention et le traitement du MAM, du fait de son effet stimulateur sur la ventilation, de son faible coût et de sa relativement bonne tolérance clinique, est potentiellement un candidat de choix pour le traitement du CMS.<sup>106,107</sup>

#### **1.6.6.2.2.1 Études cliniques**

L'ACZ a été évalué pour le traitement du CMS dans plusieurs études cliniques randomisées contre placebo conduites à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou).<sup>234-236</sup> Ainsi, dans une étude princeps, randomisée contre placebo et conduite en double aveugle, Richalet et coll.<sup>234</sup> ont montré qu'une dose journalière de 250 mg d'ACZ administrée pendant 3 semaines était efficace pour obtenir une réduction relative de l'Hct d'environ 7%, et s'accompagnait d'une amélioration de l'hypoxémie nocturne et d'une réduction de l'index d'apnée-hypopnée, chez des patients présentant un CMS. Une dose journalière plus élevée (500 mg/j), ne s'accompagnait pas d'un effet plus marqué sur la réduction de l'Hct, ni d'une augmentation plus importante de la réponse ventilatoire hypoxique.<sup>234,237</sup> Cet effet positif sur l'oxygénation et la réduction de l'Hct (diminution de l'ordre de 5% en valeur absolue) a été confirmé par la suite dans au moins deux études randomisées contre placebo,<sup>235,236</sup> avec une efficacité montrée comme persistante jusqu'à six mois de traitement.<sup>235</sup> Après six mois de traitement, un traitement par ACZ s'accompagnait également d'une augmentation du DC, et d'une diminution des RVP, sans modification de la PAPs (indirectement évalués en échographie cardiaque transthoracique), probablement en raison d'une diminution de la viscosité sanguine (non mesurée dans cette étude).<sup>235</sup> Cet effet bénéfique de l'ACZ sur les RVP était également observé dans une étude animale et était corrélé à une diminution de la viscosité sanguine.<sup>238</sup>

De manière intéressante, dans ces études, chez les patients CMS traités par placebo, il était également observé, en l'absence de diminution de l'Hct, une diminution significative du score CMS et une amélioration de la qualité de vie.<sup>234-236</sup> Cet effet placebo souligne que la subjectivité dans l'évaluation semi-quantitative des signes et symptômes inclus dans le score CMS de Qinghai, font de ce score, un critère peu fiable pour évaluer l'efficacité d'un traitement dans des études cliniques.

Malgré ces résultats encourageants, l'ACZ ne s'est pas imposé comme un traitement courant du CMS dans les régions de haute altitude où la prévalence du CMS est élevée, comme dans les Andes. Ainsi, à notre connaissance, il n'existe aucune étude de phase IV publiée, permettant de confirmer l'efficacité et la tolérance de l'ACZ en situation de vie réelle à plus long terme, chez les patients souffrant de CMS.

#### **1.6.6.2.2 Mécanismes d'action sous-jacents**

Le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) l'ACZ permet une réduction de la [Hb] ou de l'Hct chez les patients présentant un CMS reste(nt) peu exploré(s). Le mécanisme le plus probable est celui d'une diminution de la stimulation érythropoïétique induite par l'amélioration de l'oxygénation systémique, en lien avec l'augmentation de la ventilation compensant l'acidose métabolique induite par l'ACZ.<sup>234,235</sup> Cependant, il a également été suggéré que l'inhibition de la réabsorption ionique induite par l'ACZ au niveau du tubule rénal proximal (un mécanisme coûteux en énergie) entraînait une diminution de la consommation locale d'oxygène, et donc une amélioration locale de l'oxygénation tissulaire, aboutissant ainsi à une diminution de la production rénale d'EPO, indépendamment de l'amélioration de l'oxygénation systémique.<sup>234</sup> Néanmoins, une étude animale s'intéressant aux effets de l'ACZ dans un modèle d'exposition chronique en hypoxie chez des rats, suggérait que la diminution de l'Hct observée chez les animaux traités par ACZ était au moins en partie liée à un mécanisme autre qu'une diminution de l'érythropoïèse.<sup>238</sup> Dans cette étude, les rats traités par ACZ (avec deux modalités de traitement : préventif ou curatif) présentaient une augmentation de l'Hct par rapport au groupe contrôle en normoxie, mais significativement plus faible que le groupe contrôle en hypoxie. L'analyse des volumes intravasculaire retrouvait, chez les rats traités par ACZ en hypoxie, une augmentation du RBCV similaire à celui des rats contrôles en hypoxie, non traités par ACZ. Néanmoins, alors que les animaux contrôles en hypoxie présentaient une contraction du PV en comparaison aux animaux contrôles en normoxie, ceux traités par ACZ en hypoxie présentaient un PV similaire à celui des animaux contrôles en normoxie, suggérant que la diminution de l'Hct observée chez les rats traités par ACZ en hypoxie était plus la conséquence d'une « restauration » (ou d'une « conservation » pour le groupe traité en préventif) du PV secondaire à l'amélioration de l'oxygénation, que la conséquence d'une diminution de la quantité de globules rouges.<sup>238</sup> Les potentiels mécanismes sous-jacents pouvant expliquer ces différences de PV, incluant le SRAA, n'étaient néanmoins pas explorés dans cette étude.

### **1.6.6.2.3 Alternatives médicamenteuses à l'acétazolamide : pistes potentielles**

Les statines, du fait de leurs effets pléiotropes,<sup>239</sup> notamment bénéfiques sur la fonction endothéliale, pourraient représenter un traitement intéressant chez les patients souffrant de CMS. De plus, du fait d'une association fréquente entre CMS et facteurs de risque cardiovasculaire,<sup>201</sup> un traitement par statines pourrait permettre une diminution du risque cardiovasculaire dans cette population. Dans un travail préliminaire conduit à La Paz (3600 m, Bolivie), l'instauration d'un traitement par atorvastatine chez des patients CMS présentant par ailleurs une dyslipidémie s'était accompagné d'une diminution de l'Hct et d'un moindre recours à la réalisation de phlébotomies.<sup>240</sup> Néanmoins, il n'existe pas d'étude randomisée évaluant l'intérêt de cette classe médicamenteuse sur la fonction vasculaire ou sur la diminution de l'Hct dans cette population.

L'hydroxyurée, par son effet inhibiteur sur la lignée érythroïde, pourrait représenter un traitement particulièrement efficace de l'EE. Si cette molécule n'a également jamais été testée dans une étude clinique randomisée dans cette indication, son utilisation a été anecdotiquement rapportée comme efficace dans le traitement de polyglobulies secondaires à des insuffisances respiratoires chroniques à La Paz (3600 m, Bolivie).<sup>241</sup> Néanmoins, le risque d'effets indésirables hématologiques graves (neutropénie, thrombopénie), nécessitant une surveillance médicale régulière, rend difficile d'envisager son utilisation dans les populations isolées de haute altitude touchées par le CMS.

## **1.6.7 Controverses actuelles**

### **1.6.7.1 Anémie en haute altitude : comment la définir ?**

L'augmentation progressive de la [Hb] avec l'altitude dans les populations vivant en haute altitude pose la question des seuils devant être utilisés dans ces populations pour définir l'anémie.<sup>61</sup> L'anémie est classiquement définie comme une [Hb] inférieure à 13 g·dL<sup>-1</sup> chez l'homme, 12 g·dL<sup>-1</sup> chez la femme et 11 g·dL<sup>-1</sup> chez l'enfant en âge préscolaire, par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), au niveau de la mer.<sup>242</sup> L'OMS a également proposé un ajustement du seuil de [Hb] corrigé à l'altitude pour définir l'anémie (ou un ajustement de la [Hb] à l'altitude en conservant les mêmes seuils), avec un facteur d'ajustement

par tranche de 500 m d'altitude entre 1000 et 4500 m d'altitude. Cet ajustement, conduit, par exemple, à rehausser le seuil d'anémie à  $16,5 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$  chez l'homme et à  $15,5 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$  chez la femme, pour une altitude de 4000 m.<sup>242</sup> Cependant, l'équation utilisée pour cet ajustement proposé par l'OMS est basée sur des travaux anciens et ne tient pas compte des différences d'adaptation hématologique entre les populations.<sup>61,118,243</sup> Ainsi, l'utilisation de cette correction à l'altitude est associée à un sur-diagnostic d'anémie dans les populations tibétaines et éthiopiennes, alors que les seuils définis au niveau de la mer sont probablement associés à un sous-diagnostic.<sup>244,245</sup> Des conclusions similaires ont été faites dans la population péruvienne, où l'application d'une correction de la [Hb] à l'altitude selon l'OMS induit une augmentation importante de la prévalence de l'anémie en haute altitude, notamment chez les enfants.<sup>246,247</sup> En considérant des modèles de régression modélisant l'augmentation de la [Hb] avec l'altitude et intégrant des corrections liées au sexe et à la zone géographique et/ou à l'ethnie, il a été proposé des seuils différents de ceux de l'OMS, pour le diagnostic d'anémie, chez l'adulte (hommes et femmes), ainsi que plus récemment chez l'enfant en âge préscolaire.<sup>118,248</sup>

#### **1.6.7.2 Quel seuil pour définir l'érythrocytose excessive ?**

Le seuil à retenir pour définir l'EE commence à faire débat dans la littérature,<sup>146</sup> entre les partisans d'un seuil unique de  $[\text{Hb}] \geq 21 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$  chez l'homme (ou éventuellement d'un  $\text{Hct} \geq 63\%$ ), tel que défini dans le consensus de 2005,<sup>126</sup> correspondant à deux écart-types au-dessus de la moyenne de [Hb] mesurée dans un groupe de jeunes habitants de Cerro de Pasco (4300 m) en bonne santé,<sup>145</sup> et une éventuelle définition d'un seuil adapté en fonction de l'altitude de résidence.<sup>118,175</sup>

Des seuils légèrement différents, tenant compte de l'altitude de résidence et en gardant la même méthodologie statistique pour définir l'EE (c'est-à-dire, deux écart-types au-dessus de la moyenne de la [Hb] observée) ont pu être suggérés ;<sup>160</sup> ainsi, dans des études conduites à La Paz (Bolivie, 3600 m), un seuil d' $[\text{Hb}] \geq 18,3 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$  (ou un seuil d' $\text{Hct} \geq 55\%$ ) chez l'homme a été utilisé dans des études pour définir l'EE.<sup>161,233</sup>

À La Rinconada (5100-5300 m, Pérou), l'utilisation d'un seuil d' $\text{Hct} \geq 63\%$  chez l'homme et  $\geq 57\%$  chez la femme, revenait à classer 44% des habitants (47% des hommes et 27% des femmes) comme présentant une EE, dans une étude observationnelle conduite chez 1594 résidents permanents de La Rinconada ; à l'inverse, le calcul d'un seuil adapté à l'altitude (correspondant à deux écart-types au-dessus de la moyenne d' $\text{Hct}$  observée), c'est-à-dire un  $\text{Hct} \geq 72\%$  chez l'homme et  $\geq 68\%$  chez la femme, revenait à classer comme présentant une

EE, seulement 13,4 % de la population globale (15,4% des hommes et 1,7% des femmes).<sup>175</sup> Il est à noter que dans une autre étude conduite à la Rinconada, la [Hb] médiane [25-75<sup>èmes</sup> percentiles] n'était significativement pas différente entre les participants symptomatiques (présentant un CMS) et les participants non symptomatiques (ne présentant pas de CMS) : 23,4 [22,3-24,4] versus 22,3 [20-23,9] g·dL<sup>-1</sup>, respectivement ( $p=0,18$ );<sup>188</sup> la [Hb] médiane des participants ne présentant pas de CMS était donc supérieure au seuil conventionnel utilisé pour définir l'EE.

Dans une étude épidémiologique conduite sur le plateau tibétain et incluant 1029 habitants de haute altitude d'origine chinoise (vivant entre 3700 et 5000 m), un seuil de [Hb] de 20 g·dL<sup>-1</sup> semblait plus adapté pour discriminer les patients symptomatiques des patients non symptomatiques (en utilisant uniquement la composante clinique du score CMS de Qinghai), que la valeur conventionnelle de 21 g·dL<sup>-1</sup>.<sup>172</sup>

Pour conclure, plutôt que de définir l'EE comme une [Hb] anormalement élevée en fonction de considérations statistiques (de manière globale ou adaptée à l'altitude de résidence), il pourrait être plus pertinent, sur un plan clinique ou physiologique, d'essayer de définir un seuil de [Hb] à partir duquel, une élévation de la [Hb] serait considérée comme préjudiciable, c'est-à-dire associée à des symptômes cliniques invalidant ou induisant une contrainte vasculaire ou cardiaque délétère et ne représentant alors plus un bénéfice en terme de transport d'oxygène dans un environnement hypoxique.<sup>172</sup>

### **1.6.7.3 Associations entre symptômes et concentration d'hémoglobine**

Dans des études transversales, le lien entre la [Hb] (ou l'Hct) et les symptômes classiquement retenus dans la définition du CMS a été montré comme particulièrement inconsistant.<sup>175,249</sup> Dans les études randomisées visant à évaluer l'efficacité de l'ACZ dans le traitement du CMS, malgré l'absence de diminution de l'Hct dans les groupes contrôles recevant un placebo, il était observé une amélioration significative de la symptomatologie présentée par les patients.<sup>234-236</sup> À La Rinconada (5100-5300 m, Pérou), dans un travail s'intéressant aux céphalées présentées par les habitants de haute altitude, les caractéristiques sémiologiques des céphalées étaient similaires entre participants présentant et ne présentant pas une EE ; en analyse multivariée, la présence de céphalées était significativement associée à une diminution de la SpO<sub>2</sub> et non pas à l'augmentation de la [Hb], questionnant, à cette altitude, sur le lien entre EE et ce symptôme (données personnelles, non publiées à ce jour).

Ces éléments questionnent sur la difficulté à évaluer la sévérité de symptômes, par définition, subjectifs, à l'aide d'une échelle semi-quantitative. De la même manière, l'évaluation de la sévérité des signes cliniques présents dans le score CMS de Qinghai (cyanose, dilatation des veines) est soumise à la subjectivité de l'examineur, et la reproductibilité inter et intra-observateur de cette évaluation n'a jamais été étudiée à notre connaissance. Ainsi, dans de nombreuses études, la présence d'une EE est généralement préférée au diagnostic de CMS comme critère d'inclusion, et dans les études thérapeutiques, la variation de [Hb] ou d'Hct représente un critère d'évaluation plus objectif que l'évolution du score CMS de Qinghai.

#### **1.6.7.4 EE et CMS chez la femme**

L'occurrence d'une EE (et donc d'un CMS) est considérée comme rare chez la femme avant la ménopause, du fait d'un caractère protecteur des hormones féminines, via un effet stimulateur sur la ventilation,<sup>169</sup> mais aussi potentiellement via un effet régulateur des œstrogènes sur l'érythropoïèse.<sup>170</sup> De plus, les menstruations constituent probablement une forme de limitation à l'augmentation de la [Hb] chez les femmes vivant en haute altitude.<sup>137,146</sup> Néanmoins, chez ces femmes, la ménopause est associée à une diminution de la SpO<sub>2</sub>, une augmentation de l'Hct et une majoration des symptômes du CMS.<sup>249,250</sup> Les femmes ne sont donc pas totalement protégées contre cette forme de maladaptation à l'hypoxie chronique.

De manière particulièrement incompréhensible, les femmes n'ont pas été incluses dans les travaux préliminaires visant à identifier les signes et symptômes associés à l'EE ayant posé les bases du consensus diagnostique de 2005.<sup>135</sup> De la même manière, l'origine du seuil de 19 g·dL<sup>-1</sup> proposé pour définir l'EE chez la femme n'est pas clairement explicité.<sup>126</sup> Les femmes sont par ailleurs également bien souvent exclues des études physiologiques s'intéressant à la physiopathologie du CMS ou à l'impact de l'EE sur l'organisme, ou encore des études thérapeutiques, avec néanmoins quelques exceptions notables.<sup>156,249</sup> Ces exclusions sont souvent justifiées par la prévalence moins importante de l'EE ou du CMS chez les femmes, ou par la nécessité et la volonté de vouloir constituer des groupes d'étude homogènes, mais peuvent, de fait, limiter l'extrapolation des résultats de ces études aux habitantes de haute altitude souffrant d'EE ou de CMS. Il paraît donc nécessaire de mener des études spécifiques concernant l'EE et le CMS chez les femmes.

## 2 Objectifs et hypothèses

Ce travail de thèse porte sur l'adaptation et la maladaptation à la vie permanente en haute altitude. Il s'inscrit dans le cadre du projet de recherche Expédition 5300 et dans la continuité des précédents travaux réalisés à La Rinconada dont les objectifs étaient de caractériser sur le plan physiologique, une population andéenne vivant de manière permanente entre 5100 et 5300 m d'altitude.<sup>151,175,188,197,219</sup> En tenant compte des précédents travaux réalisés et des éléments généraux développés en introduction concernant l'impact de l'EE ou du CMS chez les habitants de haute altitude présentant cette forme de maladaptation à la vie permanente en haute altitude, les questions et hypothèses suivantes ont été formulées :

### **Étude 1 : Évolution de l'érythrocytose excessive et du mal chronique des montagnes au cours du temps de résidence en haute altitude – Une étude épidémiologique longitudinale**

L'objectif de cette étude était d'investiguer l'évolution de paramètres physiologiques simples (Hct et SpO<sub>2</sub>) et des symptômes du CMS, au cours des années de résidence en haute altitude, chez des habitants de La Rinconada (5100-5300 m, Pérou). Plus spécifiquement, nous avons cherché à évaluer l'incidence cumulée de l'EE et du CMS au cours des années de résidence en haute altitude, ainsi que les facteurs associés avec l'évolution de l'Hct et du score total de CMS de Qinghai. Nous avons formulé l'hypothèse que les incidences cumulées de l'EE et du CMS augmentaient avec les années de résidence en haute altitude et que l'augmentation de l'Hct et l'augmentation du score total de CMS de Qinghai au cours du temps étaient associées à la durée de résidence, indépendamment de l'âge à l'inclusion.

### **Étude 2 : Métabolisme du fer chez les habitants de haute altitude souffrant de mal chronique des montagnes – Une étude observationnelle transversale**

L'objectif de cette étude était d'explorer comment le métabolisme du fer s'adaptait chez les habitants de haute altitude, présentant ou non un CMS, et vivant de manière permanente à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou). Nous avons formulé l'hypothèse que, malgré une demande érythropoïétique élevée, ces habitants de haute altitude, exposés à une hypoxie stable et permanente, présentaient une homéostasie du fer conservée, c'est à dire un état d'équilibre entre demande (consommation) et disponibilité en fer.

### **Étude 3 : Impact de l'érythrocytose excessive sur la coagulation chez les habitants de La Rinconada – Une étude observationnelle transversale**

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact potentiel de l'érythrocytose excessive sur la coagulation, mesurée sur sang total, en utilisant la thromboélastométrie rotative (ROTEM®), chez les habitants de haute altitude vivant de manière permanente à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou), et en complétant cette mesure par des dosages des facteurs et des inhibiteurs de la coagulation, ainsi que par la réalisation d'un test de génération de thrombine. En partant des résultats d'une étude préliminaire conduite à La Rinconada,<sup>219</sup> nous avons formulé l'hypothèse que les habitants de haute altitude souffrant d'érythrocytose excessive présentaient un état d'hypercoagulabilité, en comparaison aux habitants de haute altitude en bonne santé et à des participants contrôles vivant en basse altitude.

### **Étude 4 : Effet précoce de l'acétazolamide sur la masse d'hémoglobine et le volume plasmatique chez des patients souffrant de mal chronique des montagnes – Analyse intermédiaire d'une étude randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo**

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'efficacité potentielle à court terme (après 3 semaines) d'un traitement par acétazolamide ou par atorvastatine, versus placebo, pour diminuer l'Hct, chez des patients souffrant de CMS et vivant à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou). Les objectifs secondaires incluaient l'évaluation de la gazométrie artérielle et la mesure des volumes intravasculaires. Nous avons émis l'hypothèse que seule l'acétazolamide réduirait l'Hct de manière significative après 3 semaines de traitement et que ce changement précoce serait médié à la fois par une diminution de l'Hb<sub>mass</sub> et une expansion du PV.

### **3 Étude 1 : Évolution de l'érythrocytose excessive et du mal chronique des montagnes au cours du temps de résidence en haute altitude – Une étude épidémiologique longitudinale**

#### **3.1 Introduction**

Dans de nombreuses études transversales, la prévalence de l'EE et du CMS augmente avec l'âge, et il a été ainsi suggéré que l'âge, en soi, était un facteur de risque d'EE et de CMS.<sup>144,176-178</sup> Le mécanisme sous-jacent avancé était alors la diminution naturelle de la ventilation avec l'âge, entraînant une accentuation de l'hypoxémie chez les sujets les plus âgés et donc une érythropoïèse accrue.<sup>176</sup> Des données discordantes ont également été publiées. Ainsi, dans l'étude conduite par Stauffer et coll.<sup>151</sup> et s'intéressant à la viscosité sanguine des habitants de la Rinconada (5100-5300 m, Pérou) souffrant de CMS, il n'était pas retrouvé, dans une analyse multivariée, d'association significative entre score CMS et âge ( $\beta=0,19$  ;  $p=0,16$ ), alors qu'il existait une tendance à une association entre score CMS et durée de résidence à la Rinconada ( $\beta=0,26$  ;  $p=0,055$ ). Néanmoins, en l'absence d'étude longitudinale spécifiquement conduite dans les populations de haute altitude, il demeure incertain de savoir s'il s'agit du vieillissement en lui-même ou s'il s'agit du temps de résidence en haute altitude qui est un facteur de risque de CMS.

De plus, des études transversales, conduites à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou) ou à la Rinconada (5100-5300 m, Pérou), ne retrouvaient pas d'association significative entre l'élévation de la [Hb] et la sévérité des symptômes du CMS (en considérant le score clinique de CMS, c'est-à-dire la somme des points liés à l'évaluation des signes et symptômes, sans tenir compte des points liés à la [Hb]).<sup>175,249</sup> Par exemple, à la Rinconada, dans l'étude transversale conduite par Hancco et coll.<sup>175</sup> chez plus de 1500 résidents entre 5100 et 5300 m d'altitude depuis au moins 1 an, il était observé, en analyse multivariée, une association significative entre la présence d'une EE et l'augmentation de l'âge ; à l'inverse, une augmentation de l'Hct, un âge supérieur à 31 ans et une durée prolongée de résidence à la Rinconada, étaient significativement associés à une moindre sévérité des symptômes (score clinique de CMS  $\leq 5$ ).

Ces résultats, à priori discordants, peuvent suggérer l'existence dans cette étude transversale d'un biais de sélection des participants. En effet, il est probable que les habitants de la Rinconada ayant développé des symptômes sévères, en lien avec une augmentation de la [Hb] liée à l'âge ou au temps de résidence à La Rinconada, aient fini par quitter la ville et soient descendus vivre à plus basse altitude (ou soient décédés).

Ainsi, en l'absence d'étude longitudinale conduite sur plusieurs années, et incluant un suivi régulier de la [Hb] (ou de l'Hct) et l'évaluation des signes et symptômes du CMS, la relation entre âge, temps passé en altitude, augmentation de la [Hb] (ou de l'Hct) et apparition ou aggravation des symptômes reste difficile à préciser. En utilisant des données recueillies prospectivement pendant plusieurs années à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou), dans le cadre de consultations médicales régulières dédiées aux mineurs et à leur famille, nous avons conduit une étude longitudinale dont l'objectif était d'évaluer l'évolution de l'Hct, de la SpO<sub>2</sub> et des symptômes du CMS au cours des années passées entre 5100 et 5300 m, ainsi que de décrire l'évolution de l'incidence cumulée de l'EE et du CMS au cours du temps.

### 3.2 Résumé

**Introduction :** Le mal chronique des montagnes (*chronic mountain sickness*, CMS) est une pathologie spécifique touchant les habitants permanents de haute altitude, caractérisée par une hypoxémie sévère, une érythrocytose excessive (EE) et la présence de signes et symptômes cliniques associés. En l'absence d'étude longitudinale, le lien entre l'âge ou la durée de résidence en altitude, l'augmentation de l'hématocrite (Hct) et l'apparition ou l'aggravation des symptômes du CMS reste insuffisamment caractérisé. Cette étude longitudinale avait pour objectif d'investiguer ces changements au cours du temps, chez les habitants de La Rinconada (5100-5300 m, Pérou).

**Méthodes :** Nous avons conduit une étude longitudinale portant sur des données recueillies de manière prospective pendant 14 ans (2005-2019) lors de consultations médicales, chez 90 hommes (âge à l'inclusion : 29 [24-41] ans), habitants permanents de La Rinconada (durée de résidence à l'inclusion : 2 [1-4] années). Les données recueillies comportaient : l'Hct, la SpO<sub>2</sub>, l'évaluation et la gradation des signes et symptômes présents dans le score de CMS de Qinghai. L'EE était définie comme un Hct  $\geq$  63% et le CMS comme un score total de CMS  $\geq$  6. Le score

clinique de CMS correspondait à la somme des points liés à l'évaluation des signes et symptômes. Les données ont été analysées en utilisant des modèles à effets aléatoires.

**Résultats :** Les prévalences de l'EE et du CMS à l'inclusion étaient respectivement de 76% (68/90 ; IC95% : 67 à 84%) et 31% (28/90 ; IC95% : 22 à 41%). Parmi les participants exempts d'EE ou de CMS à l'inclusion, les taux d'incidence de l'EE et du CMS au cours des 14 années de suivi étaient respectivement de 6,3 (IC95% : 5,0 à 7,8) et 4,4 (IC95% : 3,4 à 5,7) cas par personne-année. L'Hct augmentait significativement au cours des années alors que la SpO<sub>2</sub> diminuait et le score clinique de CMS augmentait avec néanmoins un décalage temporel par rapport à l'augmentation de l'Hct. En analyse multivariée (modèles linéaires mixtes), le nombre d'années de suivi, mais pas l'âge à l'inclusion, était significativement associé à l'augmentation de l'Hct et à l'augmentation du score total de CMS.

**Conclusion :** La durée de résidence en haute altitude était associée à une augmentation progressive de l'Hct et à une augmentation progressive du score de CMS, suggérant que la durée d'exposition hypoxique était un facteur associé au développement de l'EE et du CMS.

### 3.3 Article publié et contribution personnelle

Les résultats de cette étude observationnelle longitudinale concernant la cinétique de l'EE et du CMS au cours du temps de résidence en haute altitude à La Rinconada ont été publiés dans la revue *Chest* en mai 2022 (*impact factor* 2021 : 10.3 ; catégorie SIGAPS A), accompagnés d'un éditorial.<sup>251,252</sup> Cette publication est reproduite ci-dessous.

Ma contribution personnelle à cette publication a été la suivante :

- Participation à la conception de l'étude.
- Participation à l'analyse statistique.
- Interprétation des données.
- Écriture de la première version du manuscrit.
- Réponse aux commentaires des relecteurs et amendement du manuscrit initialement soumis.

## Excessive Erythrocytosis and Chronic Mountain Sickness in the Highest City in the World



### A Longitudinal Study

#### To the Editor:

Chronic mountain sickness (CMS), a specific condition affecting 5% to 33% of high-altitude dwellers, is characterized by severe hypoxemia, excessive erythrocytosis (EE), and a range of associated clinical symptoms.<sup>1,2</sup> Previous studies showed that the prevalence of EE and CMS increases with age.<sup>3-6</sup> However, because of the lack of longitudinal studies,

whether ageing per se or the duration of high-altitude residency is promoting EE and CMS remains unclear.<sup>2,3,5</sup> Furthermore, we and others<sup>7,8</sup> previously challenged in cross-sectional studies the relationship between EE and clinical symptoms of CMS, with both high hematocrits and CMS symptoms showing minimal correlation. However, these studies were not designed to assess the time course of EE and CMS symptom development, and longitudinal studies are still lacking to better understand the relationship between the development of EE, CMS symptoms, and the duration of high-altitude residency. Thus, this longitudinal study aimed to prospectively investigate EE, CMS symptoms, and changes in physiologic variables in dwellers from the highest city in the world.

#### Methods

Between 2005 and 2019, we conducted a longitudinal follow-up of 90 male dwellers from La Rinconada (5,100-5,300 m), a gold mining town located in southeastern Peru and considered the highest city in the world.<sup>9</sup> Participants (all born at 3,500-4,500 m and permanently living in La Rinconada) were recruited during a medical consultation for families of miners and had at least 1 year of residency in La Rinconada at the time of inclusion.<sup>7</sup> The study was approved by the ethics committees of Inter-région Rhône-Alpes-Auvergne (IRB-5891) and Universidad Nacional Mayor de San Marcos (CIEI-2019-002).

#### Data Collection

Each highlander was examined at least once a year during the study period. During each visit, the seven clinical symptoms of CMS (Table 1) were collected and scored according to the Qinghai CMS score (ranging from 0/no symptom to 3/severe symptom) and reported further as the CMS clinical score<sup>8</sup>; Hematocrit was measured from capillary blood samples using a microhematocrit centrifugation, and EE was defined as a hematocrit  $\geq$  63%, based on

the current international consensus; CMS diagnosis was made in case of a total Qinghai CMS score  $>$  5, including the presence of EE (adding 3 points to the CMS clinical score).<sup>1</sup> Oxygen saturation (SpO<sub>2</sub>) was measured by a finger sensor (NELLCOR OxiMaxN-65, TycoHealthcare) after a 5-minute rest period in a sitting position.

#### Statistical Analyses

Data were expressed as mean  $\pm$  SD or median [25th-75th percentiles]. Prevalence of EE and CMS at inclusion were reported with their 95% CI, as well as the crude incidence of EE and CMS during the study period, among the disease-free highlanders at baseline. To assess the longitudinal changes of the continuous variables, generalized linear mixed models were computed, with years as fixed effect and participant as random effect. Progressive changes in EE and CMS incidences over the years were visualized using cumulative incidence curves. Exploratory linear mixed models were performed to investigate the association of potential a priori independent predictors available (SpO<sub>2</sub>, CMS clinical score, age at inclusion, years of residency in La Rinconada, and years of follow-up),<sup>2,7</sup> with changes in both hematocrit and total CMS score over the time.

#### Results

Among the 90 highlanders (29 [24-41] years old on inclusion; previous residency time in La Rinconada, 2 [1-4] years) included in 2005, prevalence of EE and CMS at baseline was 76% (68/90; 95% CI, 67%-84%) and 31% (28/90; 95% CI, 22%-41%), respectively. None of them took medication (eg, acetazolamide) against EE or CMS. Among the disease-free highlanders at inclusion in 2005 (ie, 22 [24%] and 62 [69%] highlanders for EE

and CMS, respectively), the crude incidence rate of EE and CMS during the total 14-years' follow-up was 6.3 (95% CI, 5.0-7.8) and 4.4 (95% CI, 3.4-5.7) cases by person-years, respectively, with a continuous and progressive rise of both incidences over the years (Fig 1). Mean hematocrit increased early during the follow-up period, whereas the changes in CMS total score (increase), SpO<sub>2</sub> (decrease), and CMS clinical score (slightly decrease then increase) were delayed (Table 1).

FOR EDITORIAL COMMENT, SEE PAGE 1136

**TABLE 1 ] Physiological Variables, CMS Symptoms, and CMS Clinical and Total Scores Changes Over the 14 Years of**

Variables	Year 0	Year 2	Year 4	Year 6	Year 8	Year 10
Spo <sub>2</sub> , %	82.6 ± 2.1	82.7 ± 2.0	82.6 ± 2.1	81.9 ± 1.3 <sup>b</sup>	82.0 ± 1.5 <sup>b</sup>	81.9 ± 1.3 <sup>b</sup>
Hematocrit, %	66.5 ± 6.9	67.1 ± 6.4 <sup>b</sup>	67.5 ± 6.2 <sup>b</sup>	67.7 ± 6.2 <sup>b</sup>	68.0 ± 6.0 <sup>b</sup>	68.3 ± 5.8 <sup>b</sup>
Breathlessness/ Palpitations						
Absent (0)	75 (83%)	80 (89%)	80 (89%)	81 (90%)	75 (83%)	72 (80%)
Mild (1)	15 (17%)	10 (11%)	10 (11%)	9 (10%)	15 (17%)	18 (20%)
Moderate (2)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Severe (3)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Sleep disturbances						
Absent (0)	84 (93%)	86 (96%)	86 (96%)	86 (96%)	71 (79%) <sup>b</sup>	67 (74%) <sup>b</sup>
Mild (1)	6 (7%)	4 (4%)	4 (4%)	4 (4%)	19 (21%)	23 (26%)
Moderate (2)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Severe (3)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Cyanosis						
Absent (0)	24 (27%)	24 (27%)	23 (26%)	23 (26%)	23 (26%)	21 (23%)
Mild (1)	38 (42%)	42 (46%)	47 (52%)	45 (50%)	45 (50%)	45 (50%)
Moderate (2)	28 (31%)	24 (27%)	20 (22%)	22 (24%)	22 (24%)	24 (27%)
Severe (3)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Dilation of veins						
Absent (0)	89 (99%)	89 (99%)	89 (99%)	89 (99%)	88 (98%)	78 (87%) <sup>b</sup>
Mild (1)	1 (1%)	1 (1%)	1 (1%)	1 (1%)	2 (2%)	12 (13%)
Moderate (2)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Severe (3)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Tinnitus						
Absent (0)	87 (97%)	90 (100%)	90 (100%)	90 (100%)	90 (100%)	90 (100%)
Mild (1)	3 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Moderate (2)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Severe (3)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Paresthesia						
Absent (0)	84 (93%)	85 (94%)	85 (94%)	84 (93%)	71 (79%) <sup>b</sup>	51 (57%) <sup>b</sup>
Mild (1)	6 (7%)	5 (6%)	5 (6%)	6 (7%)	19 (21%)	39 (43%)
Moderate (2)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

**TABLE 1 ] (Continued)**

Variables	Year 0	Year 2	Year 4	Year 6	Year 8	Year 10	Year 12	Year 14	P <sup>b</sup>
Severe (3)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Headache									
Absent (0)	32 (36%)	47 (52%)	51 (57%)	47 (52%)	38 (42%)	28 (31%)	35 (43%)	31 (46%)	NS
Mild (1)	47 (52%)	42 (47%)	39 (43%)	43 (48%)	52 (58%)	60 (67%)	43 (53%)	37 (54%)	
Moderate (2)	11 (12%)	1 (1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (2%)	3 (4%)	0 (0%)	
Severe (3)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
CMS clinical score	1.9 ± 1.3	1.7 ± 1.2 <sup>b</sup>	1.6 ± 1.2 <sup>b</sup>	1.6 ± 1.1 <sup>b</sup>	2.1 ± 1.2 <sup>b</sup>	2.4 ± 1.2 <sup>b</sup>	2.3 ± 1.3 <sup>b</sup>	2.2 ± 1.3 <sup>b</sup>	< .001
Total CMS score	3.9 ± 2.1	4.0 ± 1.9	4.0 ± 1.9	4.0 ± 1.9	4.5 ± 1.8 <sup>b</sup>	4.8 ± 1.8 <sup>b</sup>	4.8 ± 1.9 <sup>b</sup>	4.6 ± 1.8 <sup>b</sup>	< .001

N = 90, except for year 12 (n = 81) and year 14 (n = 68, except for hematocrit, n = 69) because of loss to follow-up. Data are expressed as mean ± SD or No. (%). Because participants have been assessed 2.7 ± 1.1 times a year, individual data were averaged by years. Each CMS symptom was scored on a 0-3 severity scale; CMS clinical score represented the sum of the seven CMS symptoms. Total CMS score was calculated according to current recommendations (see Methods for more details). CMS = chronic mountain sickness; NS = nonsignificant; SpO<sub>2</sub> = pulse oxygen saturation.

<sup>a</sup>For simplicity, data are presented every 2 years, but P value for year's effect refers to years of follow-up as a continuous variable. For clarity, data regarding to CMS symptoms are presented as categorical by degree of severity but were analyzed as continuous variables, considering a binomial generalized linear mixed model or a Poisson regression as appropriate.

<sup>b</sup>Significant difference (P < .01) compared with the baseline value at year 0 (2005) and obtained from mixed models considering years of follow-up as a categorical variable.

Linear mixed model with hematocrit as dependent variable revealed that SpO<sub>2</sub> (coef -0.12 [95% CI, -0.08 to -0.16]; P < .001), CMS clinical score (coef 0.15 [95% CI, 0.09-0.22]; P < .001), and the years of follow-up (coef 0.12 [95% CI: 0.11-0.13], P < .001), but not age on inclusion, were significantly associated with the increase in hematocrit over time. In a similar model (not including the CMS clinical score variable), with CMS total score as dependent variable, SpO<sub>2</sub> (coef -0.08 [95% CI, -0.10 to -0.05]; P < .001) and the years of follow-up (coef 0.07 [95% CI, 0.06-0.08]; P < .001) remained significantly associated with the increase in CMS total score over time.

### Discussion

This longitudinal study showed that in relatively young highlanders, both EE and CMS occurrence increase over the years spent at 5,100 m, with an independent relationship between the increase in hematocrit and CMS total score and the duration of residency at high altitude. To our knowledge, this is the first longitudinal study assessing hematocrit and CMS symptoms changes in highlanders. The fact that the increase in hematocrit and CMS total score was independent of the age at inclusion suggests that the time spent at high altitude is a major risk factor for EE and CMS occurrence. SpO<sub>2</sub> also appears as an independent factor associated with both EE and CMS, suggesting that both the duration and severity of hypoxic exposure underlie the development of these chronic high-altitude diseases. Nevertheless, other important findings from this study should also be underlined. First, the high initial prevalence of EE (76%) in this population permanently living above 5,000 m raises the pertinence of a unique threshold to define EE (based on the mean ± 2 SD value measured at 4,300 m<sup>1,3,6</sup>) rather than thresholds corrected for the altitude level.<sup>7</sup> Second, the modest decrease in SpO<sub>2</sub> (albeit statistically significant), delayed compared with the early rise in hematocrit (Table 1), may question the relationship between hypoxemia and EE. A common hypothesis about EE includes an exacerbation of erythrocytosis caused by severe hypoxemia in some highlanders induced by a relative hypoventilation.<sup>2</sup> However, it also has been suggested that EE may, by itself, impair pulmonary ventilation/perfusion ratio, and thus worsen hypoxemia, which could further exacerbate erythrocytosis.<sup>10</sup> The exact timeframe and interaction between hypoxemia and EE remain to be investigated. Third, the delayed increase in CMS symptom severity (reflected by the CMS clinical score) suggests that several years are probably required before EE leads to

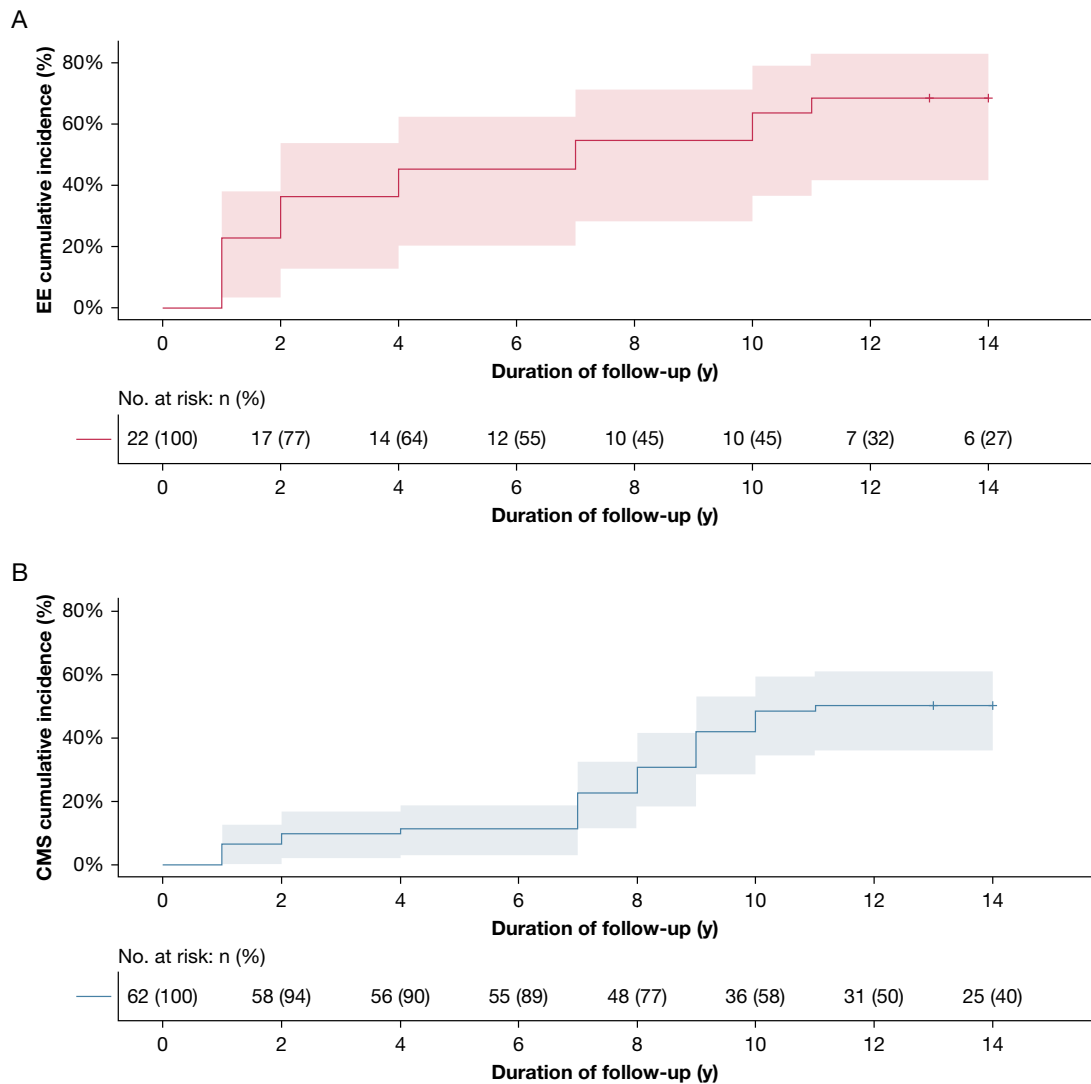


Figure 1 – A, B, Cumulative incidence of EE (defined as a hematocrit > 63%) (A) and CMS<sup>1</sup> (B) with their 95% CI over the 14-year (2005-2019) study period. Vertical tick-marks represent censored data (n = 2, due to loss of follow-up). CMS = chronic mountain sickness; EE = excessive erythrocytosis.

clinical symptoms.<sup>7</sup> These findings may explain at least in part the lack of relationship between EE and CMS symptoms highlighted in previous cross-sectional studies.<sup>7,8</sup> To conclude, despite some limitations (eg, the lack of additional physiological data over the follow-up period), this study provides unique insights into the association between chronic severe hypoxic exposure and the occurrence of EE and CMS in high-altitude dwellers. Further studies are required for confirming a causality relationship.

Benoit Champigneulle, MD  
Ivan Hanco, MD

Etienne Hamard, MSc  
Stéphane Doutreleau, MD, PhD  
Michael Furian, PhD  
Julien V. Brugniaux, PhD  
Sébastien Bailly, PharmD, PhD  
Samuel Vergès, PhD  
Grenoble, France

**AFFILIATIONS:** From the HP2 Laboratory, INSERM U1300, Grenoble Alpes University, CHU Grenoble Alpes.

**FINANCIAL/NONFINANCIAL DISCLOSURES:** None declared.

**FUNDING/SUPPORT:** S. V. is supported by the Grenoble Alpes University foundation, the “Fonds de dotation AGIR pour les maladies chroniques,” and by the French National Research Agency (ANR-12-TECS-0010) in the framework of the “Investissements d’avenir” program (ANR-15-IDEX-02). S. B. is supported by the

Multidisciplinary Institute in Artificial Intelligence, Grenoble Alpes University (ANR-19-P3IA-0003).

**CORRESPONDENCE TO:** Benoit Champigneulle, MD; email: [bchampigneulle@chu-grenoble.fr](mailto:bchampigneulle@chu-grenoble.fr)

Copyright © 2021 American College of Chest Physicians. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

**DOI:** <https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.11.030>

## Acknowledgments

**Role of sponsors:** The sponsor had no role in the design of the study, the collection and analysis of the data, or the preparation of the manuscript.

## References

1. León-Velarde F, Maggiorini M, Reeves JT, et al. Consensus statement on chronic and subacute high altitude diseases. *High Alt Med Biol.* 2005;6(2):147-157.
2. Villafuerte FC, Corante N. Chronic mountain sickness: clinical aspects, etiology, management, and treatment. *High Altitude Medicine & Biology.* 2016;17(2):61-69.
3. León-Velarde F, Arregui A, Monge C, Ruiz HR y. Aging at high altitudes and the risk of chronic mountain sickness. *J Wilderness Med.* 1993;4(2):183-188.
4. Whittembury J, Monge C. High altitude, haematocrit and age. *Nature.* 1972;238(5362):278-279.
5. Sime F, Monge C, Whittembury J. Age as a cause of chronic mountain sickness (Monge's disease). *Int J Biometeorol.* 1975;19(2):93-98.
6. Monge C, León-Velarde F, Arregui A. Increasing prevalence of excessive erythrocytosis with age among healthy high-altitude miners. *N Engl J Med.* 1989;321(18):1271-1272.
7. Hanco I, Bailly S, Baillieux S, et al. Excessive erythrocytosis and chronic mountain sickness in dwellers of the highest city in the world. *Front Physiol.* 2020;11:773.
8. Gonzales GF, Rubio J, Gasco M. Chronic mountain sickness score was related with health status score but not with hemoglobin levels at high altitudes. *Respir Physiol Neurobiol.* 2013;188(2):152-160.
9. Enserink M. Hypoxia city. *Science.* 2019;365(6458):1098-1103.
10. Cruz JC, Diaz C, Marticorena E, Hilario V. Phlebotomy improves pulmonary gas exchange in chronic mountain polycythemia. *Respiration.* 1979;38(6):305-313.

## **4 Étude 2 : Métabolisme du fer chez les habitants de haute altitude souffrant de mal chronique des montagnes – Une étude observationnelle transversale**

### **4.1 Introduction**

Dans une étude préalablement publiée, il avait été mesuré à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou), des  $Hb_{mass}$  extrêmement élevées, sans différence significative observée dans cette étude entre les individus en bonne santé et ceux présentant un CMS léger ou modéré à sévère.<sup>188</sup> Ainsi, dans cette étude, le RBCV calculé chez les habitants de La Rinconada en bonne santé était en médiane [25<sup>ème</sup>–75<sup>ème</sup> percentiles] de 72,3 [58,7–95,6]  $mL \cdot kg^{-1}$ , alors qu'il était de 34,0 [29,5–36,6]  $mL \cdot kg^{-1}$  dans le groupe des participants témoins à Lima (0 m, Pérou). Il semble implicite qu'une augmentation aussi importante du RBCV nécessite de grandes quantités de fer et possiblement une adaptation des mécanismes de régulation du métabolisme du fer, en comparaison aux habitants de plaine.

Comme présenté dans l'introduction générale de ce travail, l'exposition aiguë en haute altitude s'accompagne d'une mobilisation des réserves en fer de l'organisme, permettant de faire face à la demande érythropoïétique induite par l'hypoxie ; cette mobilisation des réserves en fer fait intervenir l'axe EPO-ERFE-hepcidine, comme précédemment décrit.<sup>80,81,87,88</sup> Le métabolisme du fer a été relativement peu étudié chez les habitants de haute altitude et notamment chez ceux présentant une EE ou un CMS.<sup>82</sup> Les données issues d'études réalisées dans la population andéenne à 4300 m semblent montrer des réserves en fer conservées chez les habitants de haute altitude en bonne santé ou présentant une EE, malgré la plus forte demande érythropoïétique.<sup>54,155</sup> Cependant, peu de données sont disponibles concernant l'adaptation potentielle de l'axe EPO-ERFE-hepcidine dans les populations de haute altitude, souffrant ou non de CMS, dans un contexte d'exposition hypoxique stable.<sup>121,191</sup>

L'objectif de cette étude était donc d'explorer l'homéostasie du fer chez les habitants de haute altitude en bonne santé ou souffrant de CMS, et vivant de manière permanente à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou).

## 4.2 Résumé de l'étude

**Introduction :** Malgré une érythropoïèse et une demande en fer constamment élevées, les habitants de haute altitude semblent maintenir leurs réserves en fer dans l'intervalle de référence. Cependant, les mécanismes sous-jacents permettant le maintien des réserves en fer n'ont pas été décrits. Cette étude avait pour objectif d'explorer l'homéostasie du fer chez les habitants de haute altitude, souffrant ou non d'un mal chronique des montagnes (*chronic mountain sickness*, CMS), et vivant de manière permanente à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou).

**Méthodes :** Cent participants de sexe masculin ont été inclus dans cette étude observationnelle transversale. Parmi-eux, 57 étaient des résidents permanents de La Rinconada, en bonne santé (n=17), ou souffrant de CMS léger (n=24) ou modéré à sévère (n=16), en accord avec le score CMS de Qinghai ; vingt-six étaient des résidents permanents de Puno (3800 m, Pérou) : sans CMS (n=18), avec un CMS léger (n=5) ou avec un CMS modéré à sévère (n=3). Dix-sept étaient des résidents en bonne santé de Lima (0 m, Pérou). La masse totale d'hémoglobine ( $Hb_{mass}$ ) a été mesurée en utilisant la technique de ré-inhalation au monoxyde de carbone (*CO rebreathing*). Les marqueurs d'érythropoïèse, de statut martial et de régulation du métabolisme du fer ont été dosés à partir d'échantillons de plasma ou de sérum.

**Résultats :** L' $Hb_{mass}$  augmentait progressivement avec l'altitude, atteignant des valeurs extrêmement élevées à 5100 m (1367 [1169-1808] grammes chez les non CMS), sans différence significative en fonction du statut CMS à 5100 m. Cette augmentation de l' $Hb_{mass}$  s'accompagnait d'une augmentation significative du taux plasmatique d'érythropoïétine ainsi que du taux de récepteurs solubles de la transferrine (sTfR), traduisant une augmentation de l'activité érythropoïétique avec l'altitude. Malgré cette augmentation de l'activité érythropoïétique, à 5100 m, chez les participants sans CMS, il n'était pas mis en évidence de modification du métabolisme du fer, avec des taux d'érythroferrone (ERFE) et d'hepcidine similaires à ceux observés chez les participants vivant au niveau de la mer, ni de diminution significative des réserves en fer (ferritinémie, coefficient de saturation de la transferrine, réserve en fer de l'organisme calculée). À 5100 m, un profil similaire était observé chez les participants

présentant un CMS léger ; à l'inverse, chez les participants présentant un CMS modéré à sévère, il était observé une augmentation significative du taux de sTfR, par rapport aux participants sans CMS, suggérant une activité érythropoïétique plus importante, malgré une Hb<sub>mass</sub> similaire. Cette augmentation du taux de sTfR s'accompagnait d'une augmentation significative de l'érythroferrone et d'une diminution significative de l'hepcidine, sans réduction des réserves en fer, en comparaison aux participants sans CMS. À 5100 m, les participants présentant un CMS modéré à sévère présentaient par ailleurs un taux d'interleukine 6 significativement plus élevé que les non CMS ou les CMS légers, sans que celui-ci ne soit néanmoins suffisant pour contrebalancer l'effet de l'ERFE sur l'hepcidine.

**Conclusion :** À 5100 m, chez les habitants de haute altitude de sexe masculin, sans CMS ou avec un CMS léger, présentant un état stable d'exposition hypoxique, l'augmentation importante de l'Hb<sub>mass</sub> ne s'accompagnait pas d'une carence martiale, et la régulation du métabolisme du fer conservait un équilibre similaire à celui observé au niveau de la mer, malgré un niveau supérieur d'érythropoïèse, pouvant laisser supposer l'implication de mécanismes de transport du fer indépendants de l'axe ERFE-hepcidine. À l'inverse, chez les CMS modérés à sévères, un important stress érythropoïétique s'accompagnait d'une induction de l'ERFE et d'une inhibition de l'hepcidine.

### 4.3 Article publié et contribution personnelle

Les résultats de cette étude observationnelle transversale concernant le métabolisme du fer chez les habitants de haute altitude ont été publiés dans la revue *HemaSphere* en mars 2023 (*impact factor* 2021 : 8.3 ; catégorie SIGAPS B).<sup>253</sup> Cette publication est reproduite ci-dessous, accompagnée de son matériel méthodologique annexe. Ma contribution personnelle à cette publication, en tant que co-premier auteur, a été la suivante :

- Participation à la conception de l'étude.
- Participation à la conduite de l'étude.
- Participation à l'analyse et à l'interprétation des données.
- Relecture et amendement du manuscrit initialement soumis.
- Participation à la réponse aux commentaires des reviewers et à la modification du manuscrit initialement soumis.

## Letter

## Open Access

## Excessive Erythrocytosis Is Not Associated With Altered Iron Homeostasis in Men From the World's Highest City

Gaetano Cairo<sup>1</sup>, Benoit Champigneulle<sup>2</sup>, Margherita Correnti<sup>1</sup>, Elena Gammella<sup>1</sup>, Stefania Recalcati<sup>1</sup>, Domenico Girelli<sup>3</sup>, Annalisa Castagna<sup>3</sup>, Anne-Kristine Meinild Lundby<sup>4</sup>, Ivan Hancoco<sup>2</sup>, Carole Chirica<sup>5</sup>, Dorra Guergour<sup>6</sup>, Laura Oberholzer<sup>6</sup>, Emeric Stauffer<sup>7,8</sup>, Carsten Lundby<sup>9</sup>, Aurélien Pichon<sup>10</sup>, Julien V Brugniaux<sup>2</sup>, Stéphane Doutreleau<sup>2</sup>, Samuel Verges<sup>2,11</sup>, Paul Robach<sup>2,11</sup>

**Correspondence:** Paul Robach (paul.robach@ensm.sports.gouv.fr).

Iron is required for hemoglobin synthesis and red blood cell (RBC) production. When erythropoiesis is stimulated, erythropoietin (EPO), downregulates hepcidin transcription in the liver. Lower hepcidin levels facilitate ferroportin-mediated iron absorption in the duodenum and iron export from reticuloendothelial cells that process old/damaged RBCs,<sup>1</sup> thereby ensuring iron availability to the erythropoietic compartment. During acute high-altitude hypoxia, increased erythropoiesis results in iron mobilization, leading to decreased iron stores.<sup>2,3</sup> By contrast, healthy permanent residents of altitudes of 3700–4380 m, chronically exposed to hypoxia, keep iron stores within the normal range, despite continuously high erythropoietic activity and iron demand.<sup>4,5</sup> Iron stores are also preserved in individuals living at 3825–4380 m who are affected by chronic mountain sickness (CMS),<sup>6,7</sup> a clinical

syndrome characterized by symptomatic excessive erythrocytosis and severe hypoxemia.<sup>8</sup> However, the mechanisms enabling iron stores to be maintained in high-altitude residents have not been described. The aim of this study was to explore how iron homeostasis adapts to chronic exposure to hypoxia in polycythemic residents from the world's highest city, La Rinconada, located at 5100 m,<sup>9</sup> both with and without CMS.

The study was approved by the Peruvian ethics committee of Universidad Nacional Mayor de San Marcos in Lima (CIEI-2019-002), and written and oral consent was obtained from each individual before participation. One hundred male participants were included in this study presenting original data on iron parameters. Of these, 69 were included in our previous study on total RBC volume (RBCV)<sup>9</sup> (Suppl. Figure S1). Of the 100 participants, 57 were permanent residents in La Rinconada (5100 m) and categorized into no CMS, mild CMS or moderate-to-severe CMS; 26 were permanent residents in Puno (3800 m), also categorized into no CMS, mild CMS or moderate-to-severe CMS; and 17 were healthy residents from Lima (sea level). Participants' ancestry is reported in Suppl. Table S1. Serum samples were used for biochemical determinations. Total hemoglobin mass (Hb<sub>mass</sub>) and RBCV were assessed by carbon-monoxide rebreathing. Details on participant recruitment, CMS scoring, methods, and statistics are available in the Suppl. Methods.

In line with our previous report,<sup>9</sup> all hematologic parameters, in particular Hb<sub>mass</sub> and RBCV, progressively increased with altitude, reaching extremely high values in residents from La Rinconada (Table 1). In those individuals, excessive erythrocytosis was accompanied by increased EPO<sup>9</sup> and soluble transferrin receptor (sTfR) levels (Table 1), confirming chronically high erythropoietic activity. However, despite high iron requirement in the bone marrow, healthy residents—particularly those at 5100 m—did not modify iron metabolism, as both erythropoietin and hepcidin concentrations remained similar to those in sea-level residents. Accordingly, healthy high-altitude residents did not develop iron deficiency (indicated by unaltered transferrin saturation and ferritin), although calculated body iron stores tended to decrease at the highest altitude (Figure 1). The absence of iron deficiency at 5100 m was associated with an increase in ceruloplasmin, a ferroxidase that permits ferroportin-to-transferrin iron transfer<sup>1</sup> (Table 1).

Also consistent with our previous report,<sup>9</sup> similar high levels of Hb<sub>mass</sub>, RBCV and EPO were found in CMS patients and healthy individuals at 5100 m, although moderate-to-severe CMS

<sup>1</sup>Department of Biomedical Sciences for Health, University of Milan, Italy

<sup>2</sup>HP2 Laboratory, University Grenoble Alpes, INSERM, CHU Grenoble Alpes, France

<sup>3</sup>Department of Medicine, University of Verona, Italy

<sup>4</sup>Department of Clinical Biochemistry, Nordsjællands Hospital, Hillerød, Denmark

<sup>5</sup>Platform of Biochemistry, University Hospital of Grenoble, France

<sup>6</sup>Department of Physical Performance, Norwegian School of Sports Sciences, Oslo, Norway

<sup>7</sup>Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité EA7424, Team Vascular Biology and Red Blood Cell, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, France

<sup>8</sup>Centre de Médecine du Sommeil et des Maladies Respiratoires, Hôpital Croix Rousse, Hospices Civils de Lyon, France

<sup>9</sup>Innland Norway University of Applied Sciences, Lillehammer, Norway

<sup>10</sup>Laboratory Mobility, Aging & Exercise-ER20296, University of Poitiers, Faculty of Sport Sciences-STAPS, Poitiers, France

<sup>11</sup>National School for Mountain Sports, Site of the National School for Skiing and Mountaineering, Chamonix, France

GC and BC share first authorship; SV and PR share senior authorship.

Supplemental digital content is available for this article.

Copyright © 2023 the Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc.

on behalf of the European Hematology Association. This is an open-access

article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non

Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible

to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be

changed in any way or used commercially without permission from the journal.

HemaSphere (2023) 7:3(e849).

<http://dx.doi.org/10.1097/HS9.0000000000000849>.

Received: September 19, 2022 / Accepted: January 23, 2023



Table 1 (Continued)

	Sea Level (Lima)		3800 m (Puno)		5100 m (La Rinconada)		Altitude (No CMS)	CMS 3800 m	CMS 5100 m	
	No CMS	Mild CMS	No CMS	Mild CMS	No CMS	Mild CMS				Mod-Sev CMS
BV, mL	4866 (4435–6184)	6442 (5165–7381)	4677 (4392–5462)	6398 (5888–7515)	6355 (5678–7718) <sup>b,c</sup>	6893 (5901–8124)	7466 (6348–8421)	0.001	0.043	0.292
BV, mL·kg <sup>-1</sup>	77.2 (68.5–80.1)	80.5 (79.5–90.5)	68.8 (62.7–78.1)	92.7 (89.6–94.3)	91.4 (81.7–104.0) <sup>b,c</sup>	100.0 (82.0–119.5)	110.2 (93.7–127.9)	<0.001	0.016	0.422

Participant characteristics of male residents at sea level, 3800 m, and 5100 m. Individuals were categorized with the CMS Qinghai score including the [Hb] criterion (CMS score ≤5 = no CMS; score of 6 to 10 = mild CMS; score > 10 = moderate-to-severe CMS).<sup>2</sup> A modified CMS score was calculated by excluding the [Hb] criterion from the regular score and only summing the points from the seven symptoms.<sup>3</sup> The effect of altitude was assessed with a Kruskal–Wallis test including participants without CMS. At each altitude (3800 and 5100 m), the effect of CMS severity was assessed with a Kruskal–Wallis test. In the case of significant main effect, post-hoc pairwise comparisons were performed using a Dunn's test with Bonferroni correction. Hb<sub>mass</sub> and intravascular volumes are reported in absolute values (g and mL, respectively) and relative to body mass (g·kg<sup>-1</sup> and mL·kg<sup>-1</sup>, respectively).  
<sup>a</sup>P < 0.05 vs no CMS, at a given altitude.  
<sup>b</sup>P < 0.05 vs sea level, among no CMS participants.  
<sup>c</sup>P < 0.05 vs 3800 m, among no CMS residents.  
<sup>d</sup>P < 0.05 vs mild CMS, at a given altitude.  
 Values are presented as median and 25th–75th percentiles. The effects of altitude (in participants without CMS) and CMS severity (at each altitude) on systemic inflammation, that is, CRP concentration > 4 mg·L<sup>-1</sup>, were assessed using Chi-square tests.  
 BMI = body mass index; BV = blood volume; CMS = chronic mountain sickness; CRP = C-reactive protein; EPO = IL-6 and sTfR, serum concentrations of erythropoietin, interleukin 6 and soluble transferrin receptor, respectively; [Hb] = hemoglobin concentration; Hb<sub>mass</sub> = total hemoglobin mass, measured by carbon-monoxide rebreathing; PV = plasma volume; RBCV = total red blood cell volume; SpO<sub>2</sub> = pulse oxygen saturation.

patients displayed trends toward even higher levels (Table 1), suggesting a stronger erythropoietic response, substantiated by higher sTfR levels (Table 1). In this subpopulation, excessive erythrocytosis was accompanied by erythroferrone induction and hepcidin inhibition (not observed at lower altitude)<sup>10</sup>; however, there was no reduction in iron stores (Figure 1). The mild inflammatory status, evidenced by slightly elevated interleukin 6 (an hepcidin inducer)<sup>1</sup> in patients with moderate-to-severe CMS at 5100 m (Table 1), seemed insufficient to counteract the decrease in hepcidin triggered by erythroferrone. To explore the effect of age on iron parameters across altitude levels and CMS status, multivariable analysis was conducted. No independent association was found between age and iron parameters (Suppl. Table S2).

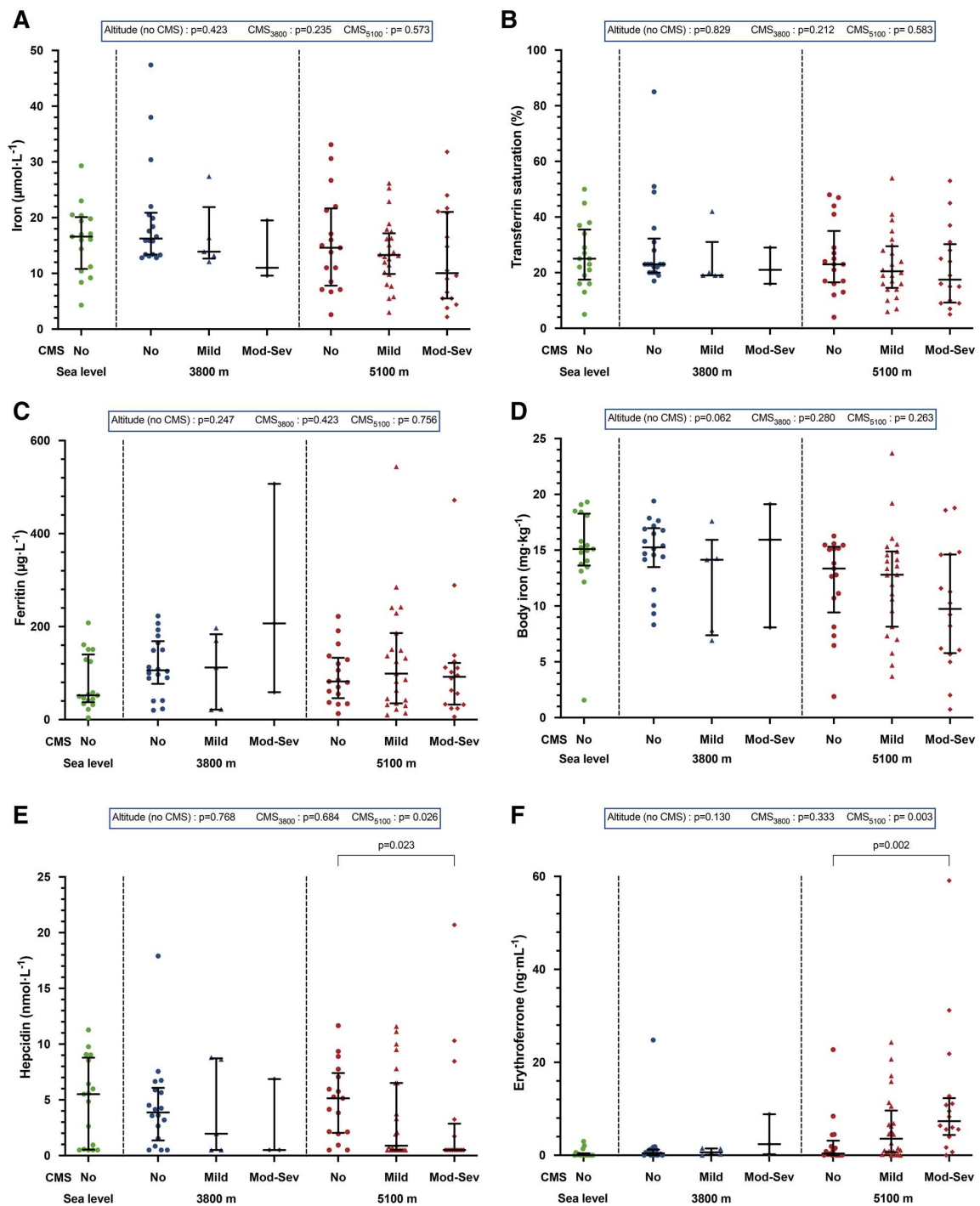
In healthy people ascending to high altitude, increased erythropoiesis is accompanied by massive mobilization of iron stores.<sup>2,3,7</sup> Similarly, in erythrocytic mice constitutively over-expressing EPO systemically,<sup>11</sup> or with gain-of-function mutation of EPO receptor,<sup>12</sup> low hepcidin levels are associated with reduced transferrin saturation and low iron stores. Conversely, normal ferritin and transferrin levels are found in Puno residents<sup>6</sup>; similarly, Ethiopian highlanders do not show decreased body iron stores despite high hemoglobin concentration.<sup>5</sup> These findings are consistent with an evolutionary adaptation against iron deficiency, as also suggested by the lower prevalence of iron deficiency in Sherpas than in lowlanders upon ascent to 5050 m.<sup>3</sup>

Our finding that iron stores were normal in healthy residents and CMS patients of the world's highest city is consistent with previous data obtained at lower altitudes. The confirmation that iron stores are maintained even in the presence of excessive erythrocytosis identified via RBCV determination highlights a strong protective mechanism but also raises questions about the mechanisms that permit massive erythropoiesis without incurring iron deficiency.

The EPO/erythroferrone/hepcidin/ferroportin axis, known to secure higher iron export by spleen and liver reticuloendothelial cells after RBC recycling, as well as increased iron absorption by duodenal enterocytes, was minimally affected by altitude and therefore does not appear to be involved. In fact, we showed that erythroferrone induction and hepcidin suppression were detectable only in moderate-to-severe CMS patients, who experience an even higher erythroid drive and iron demand.

The unexpected lack of erythroferrone induction and hepcidin repression in healthy residents at very high altitude, despite chronically high EPO levels, may reflect very effective erythropoiesis, which is evidenced by massive RBCV expansion (Table 1). Erythroferrone primarily responds to acute erythropoietic stimulation and an expanded erythroblast population during ineffective erythropoiesis.<sup>1</sup> Moreover, the absence of iron deficiency among high-altitude residents, including CMS patients, suggests that hepcidin downregulation may not be promoted by a loss of iron stores, as previously suggested during short-term hypoxia.<sup>4</sup>

The absence of significant losses of stored iron suggests that high-altitude residents provide iron to the bone marrow mainly by increasing absorption and/or efficiently recycling iron derived by the higher number of processed RBCs. Hypoxia may improve iron absorption in a hepcidin-independent manner by stabilizing the alpha subunit of HIF-2 and subsequently, the HIF-2 heterodimer increases expression of intestinal iron transporters, as demonstrated in healthy lowlanders acutely exposed to hypoxia.<sup>2</sup> Similarly, *SLC40A1*, the hypoxia-responsive gene that encodes ferroportin,<sup>1</sup> could be transcriptionally upregulated in macrophages, thus maintaining elevated iron export despite unaltered hepcidin levels. Ceruloplasmin, which is induced by hypoxia,<sup>13</sup> is increased at 5100 m, suggesting an additional mechanism to achieve efficient iron mobilization, uptake, and transfer to the erythropoietic compartment. Finally,



**Figure 1. Excessive erythrocytosis does not alter iron homeostasis in men at 5100 m.** Individual serum concentrations of iron (A), ferritin (C), hepcidin (E) and erythroferrone (F), as well as transferrin saturation (B) and calculated body iron (D), determined in sea-level residents ( $n = 17$ ) and high-altitude residents at 3800 m (Puno,  $n = 26$ ) and 5100 m (La Rinconada,  $n = 57$ ). Lines indicate medians and 25th–75th percentiles. High-altitude residents were categorized into no CMS, mild CMS, or moderate-to-severe CMS (see Table 1 indicating the number of participants in each subgroup). The effect of altitude was assessed with a Kruskal–Wallis test including participants without CMS. At each altitude (3800 m and 5100 m), the effect of CMS was assessed with a Kruskal–Wallis test. Pairwise comparisons were performed using a Dunn’s test with Bonferroni correction and visualized with brackets above the graphs.  $n = 23$  for ferritin and calculated body iron in the mild CMS group at 5100 m. The formula for calculating body iron is available in the Suppl. Methods. CMS = chronic mountain sickness.

a possible mechanism uncoupling iron uptake from increasing hemoglobin levels might be that the oxygen-sensing pathway in duodenal enterocytes acts independently of the hemoglobin concentrations.<sup>14</sup> In chronic hypoxia, these mechanisms may provide sufficient iron for steady—although very high—RBC production, reflecting an equilibrium between increased iron availability and increased iron consumption.

In conclusion, male residents from the world's highest city experience excessive erythrocytosis and massive RBCV expansion without concomitant iron deficiency, presumably since iron regulation reaches equilibrium at a different level of erythropoiesis, through optimization of iron transport mechanisms not involving the erythroferrone/hepcidin axis. Only the additional erythropoietic stress present in moderate-to-severe CMS patients induces erythroferone and blunts hepcidin to face the even higher iron requirement for RBC production. At a functional level, very-high-altitude residents display normal iron stores in association with low prevalence of hypoxic pulmonary hypertension,<sup>15</sup> a clinical sign of CMS.<sup>8</sup> Since higher HIF signaling is the putative mechanism for pulmonary hypertension, and iron depletion decreases the activity of prolyl hydroxylase—the major negative regulator of HIFs—thereby exacerbating hypoxic pulmonary hypertension,<sup>7</sup> we suggest that maintaining iron stores in those residents may help to protect their pulmonary vasculature from hypertension.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the study volunteers for their commitment and time invested in this study. Furthermore, thanks are extended to the Peruvian medical students who assisted in the participant recruitment and screening for this study. The authors also thank Severine Lambing and Vincent Rocher from Radiometer France for their excellent technical assistance. Finally, we wish to thank Prof. Philippe Connes for his expert contribution, and Violette Viard for helping in the manuscript's preparation. The manuscript has been revised for the English by an independent scientific language editing service (Angloscribe).

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

GC, BC, SV, and PR designed the study; BC, IH, LO, ES, AP, JVB, SD, and SV performed the study; MC, EG, SR, DG, AC, A-KML, CC, DG, CL, SV, and PR contributed vital new reagents or analytical tools; BC and PR analyzed data; GC and PR wrote the paper; BC, MC, EG, SR, DG, AC, CC, DG, LO, CL, AP, JVB, SD, and SV edited and revised the manuscript; all authors approved the final version of the manuscript.

#### DISCLOSURES

The authors have no conflicts of interest to disclose.

#### SOURCES OF FUNDING

This study was supported by the Grenoble Alpes University foundation, the “Fonds de dotation AGIR pour les maladies chroniques,” the French National Research Agency (ANR-12-TECS-0010) as part of the “Investissements d'avenir” program (ANR-15-IDEX-02), and the University of Milan, project Linea 2.

#### REFERENCES

1. Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, et al. A red carpet for iron metabolism. *Cell*. 2017;168:344–361.
2. Goetze O, Schmitt J, Spliethoff K, et al. Adaptation of iron transport and metabolism to acute high-altitude hypoxia in mountaineers. *Hepatology*. 2013;58:2153–2162.
3. Willie CK, Patrician A, Hoiland RL, et al. Influence of iron manipulation on hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary reactivity during ascent and acclimatization to 5050 m. *J Physiol*. 2021;599:1685–1708.
4. Muckenthaler MU, Mairbaurl H, Gassmann M. Iron metabolism in high-altitude residents. *J Appl Physiol* (1985). 2020;129:920–925.
5. Lundgrin EL, Janocha AJ, Koch CD, et al. Plasma hepcidin of Ethiopian highlanders with steady-state hypoxia. *Blood*. 2013;122:1989–1991.
6. De Ferrari A, Miranda JJ, Gilman RH, et al. Prevalence, clinical profile, iron status, and subject-specific traits for excessive erythrocytosis in Andean adults living permanently at 3,825 meters above sea level. *Chest*. 2014;146:1327–1336.
7. Smith TG, Talbot NP, Privat C, et al. Effects of iron supplementation and depletion on hypoxic pulmonary hypertension: two randomized controlled trials. *JAMA*. 2009;302:1444–1450.
8. Leon-Velarde F, Maggiorini M, Reeves JT, et al. Consensus statement on chronic and subacute high altitude diseases. *High Alt Med Biol*. 2005;6:147–157.
9. Oberholzer L, Lundby C, Stauffer E, et al. Reevaluation of excessive erythrocytosis in diagnosing chronic mountain sickness in men from the world's highest city. *Blood*. 2020;136:1884–1888.
10. Talbot NP, Smith TG, Lakhali-Littleton S, et al. Suppression of plasma hepcidin by venesection during steady-state hypoxia. *Blood*. 2016;127:1206–1207.
11. Diaz V, Gammella E, Recalcati S, et al. Liver iron modulates hepcidin expression during chronically elevated erythropoiesis in mice. *Hepatology*. 2013;58:2122–2132.
12. Kralova B, Sochorcova L, Song J, et al. Developmental changes in iron metabolism and erythropoiesis in mice with human gain-of-function erythropoietin receptor. *Am J Hematol*. 2022;97:1286–1299.
13. Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Fox PL. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem*. 2000;275:21048–21054.
14. Staub K, Haeusler M, Bender N, et al. Hemoglobin concentration of young men at residential altitudes between 200 and 2000 m mirrors Switzerland's topography. *Blood*. 2020;135:1066–1069.
15. Doutreleau S, Ulliel-Roche M, Hancoo I, et al. Cardiac remodelling in the highest city in the world: effects of altitude and chronic mountain sickness. *Eur J Prev Cardiol*. 2022;29:2154–2162.

1 **Supplemental Methods**

2

3 **Participant recruitment**

4 This study is based on two cohorts of participants during two expeditions, enrolled in 2019 and 2020. Details  
5 of participant recruitment for both cohorts are available in our previous report.<sup>1</sup> Participants in La Rinconada  
6 (60,000 inhabitants, among whom ~35,000 are men), the world's highest city located at 5,100 m in Southern  
7 Peru, were workers from gold mines. The prevalence of chronic mountain sickness (CMS) in La Rinconada  
8 determined with the CMS Qinghai score (see below) ranges from 16%<sup>2</sup> to 31%<sup>3</sup> in men. Participants in Puno  
9 (125,000 inhabitants among whom approx. 60,000 are men), located at 3,800 m in Peru, were recruited as  
10 high-altitude controls through local advertisement. The CMS prevalence in Puno was previously reported to  
11 be ~5%.<sup>4</sup> Participants in Lima were recruited as sea-level controls via local advertisement. All study  
12 participants were men, born at <1,000 m for sea-level controls, or >3,500 m for high-altitude residents, who  
13 have lived at the respective altitude for the past ≥3 years. Accordingly, all study participants recruited at  
14 3,800 m and 5,100 m were high-altitude natives. The presence of non-altitude-related symptoms of disease,  
15 e.g., respiratory disease, was an exclusion criterion. The participants in La Rinconada comprised individuals  
16 born at lower altitude (>3,500 m), mostly originating from the Puno region, who moved to La Rinconada to  
17 work in the gold mines. Moreover, the recruited individuals were either of Quechua or Aymara ancestry and  
18 there was a fraction of individuals with unknown ancestry tested at sea level ([Supplemental Table 1](#)).  
19 Indigenous human populations on the Andean Altiplano are descendants of colonizers who arrived  
20 approximately 11,000 years ago.<sup>5</sup> Prior to the study, CMS patients were not followed by a physician, and they  
21 did not receive phlebotomy or any other treatment. The diet of the residents of Puno and La Rinconada was  
22 characterized by a low consumption of fruits and vegetables. In the absence of a nutritional survey in the  
23 present study, nutrient intakes in each group - particularly iron intake - remain unknown. However, it is  
24 possible to suggest that dietary iron intake was not substantially different among study participants, as recent  
25 data in Andeans indicate similar iron intake in highlanders (with or without CMS) and lowlanders.<sup>6</sup>

26

27 **CMS Qinghai score**

28 The CMS Qinghai score is the sum of points given for i) seven clinical symptoms (breathlessness and/or  
29 palpitations, sleep disturbance, cyanosis, dilatation of veins, paresthesia, headache, tinnitus), each graded  
30 from 0 (no symptoms) to 3 (severe symptoms); and ii) one clinical sign, the presence of an excessive  
31 erythrocytosis, defined as a hemoglobin concentration ([Hb]) ≥ 21 g.dl<sup>-1</sup> in men, giving 3 points.<sup>7</sup> According  
32 to the most recent consensus, CMS is defined as absent (score 0-5), mild (6-10), moderate (11-14), or severe

33 (>15).<sup>7</sup> A modified CMS score was calculated by excluding the [Hb] criterion from the regular score and only  
34 summing the points from the seven symptoms.

35

### 36 **Carbon monoxide rebreathing and serum analyses**

37 Carbon monoxide (CO) rebreathing was performed for 10 min (2019 expedition) or 14 min (2020 expedition)<sup>8</sup>  
38 using an automated system (OpCO, Detalo Health, Copenhagen, Denmark) as previously described,<sup>9</sup> with a  
39 dose of 1.5 ml CO per kg body mass. Venous blood was sampled prior to and at 10 or 14 min of CO rebreathing  
40 and analyzed for %carboxyhemoglobin, [Hb] (ABL80 OSM, Radiometer, Copenhagen, Denmark) and  
41 hematocrit (microcentrifuge method) to calculate total hemoglobin mass, which is the total circulating  
42 number of hemoglobin molecules. Total red blood cell volume was determined by multiplying total  
43 hemoglobin mass by hematocrit and dividing by [Hb]. Total red blood cell volume and total hemoglobin mass  
44 usually have a corresponding increase or decrease. Blood volume and plasma volume were derived thereof.<sup>10</sup>

45 Serum concentrations of erythropoietin were analyzed with an ELISA kit (Human Erythropoietin Quantikine  
46 IVD ELISA Kit; R&D Systems). Serum concentrations of iron were determined with a colorimetric assay,  
47 transferrin, soluble transferrin receptor (sTfR) and C-reactive protein (CRP) with immunoturbidimetric assays,  
48 and ferritin with an immunochemiluminometric assay. Serum concentrations of interleukin-6 (IL-6) were  
49 determined with the Meso Scale Discovery (MSD) V-PLEX Human IL-6 kit (Meso Scale Diagnostics). Serum  
50 concentrations of erythroferrone were determined using an ELISA assay (Intrinsic Life Science), as previously  
51 described.<sup>11</sup> Serum concentrations of hepcidin were measured by LC-MS/MS analysis, as described  
52 elsewhere.<sup>12</sup> When serum concentrations of sTfR, erythroferrone and hepcidin were below the lower  
53 threshold of detection, the minimum value of detection was assigned.<sup>13</sup> Ceruloplasmin activity was  
54 determined using the validated Ceruloplasmin Colorimetric Activity Kit (EIA CPLC, Invitrogen) according to the  
55 manufacturer's instructions. Serum samples diluted to obtain concentrations within the range of standard  
56 curve were incubated with the substrate at 30 °C for 60 minutes, and absorbance was measured at 560 nm  
57 using the GloMax® Discover microplate reader (Promega, Milano, Italy). The obtained values were in the  
58 range of those reported by the manufacturer using serum of healthy individuals. The sera were analyzed in  
59 duplicates for erythroferrone, hepcidin, ceruloplasmin, erythropoietin and IL-6; the values used are the  
60 means of the duplicates.

61 Estimation of body iron stores was calculated from soluble transferrin receptor (sTfR) and ferritin serum  
62 concentrations (both expressed in  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), as previously described,<sup>14</sup> using the following formula:

63 
$$\text{Body iron (mg} \cdot \text{kg}^{-1}) = - \frac{\left[ \log \left( \frac{\text{sTfR}}{\text{serum ferritin}} \right) - 2.8229 \right]}{0.1207}$$

64

65 At 5,100 m, individuals with moderate-to-severe CMS tended to display lower plasma volume, in comparison  
 66 to healthy or mild-CMS residents ([Table 1](#)). Although not significant ( $P = 0.278$ ), this difference suggests that  
 67 contents (i.e., concentrations  $\times$  plasma volume) may be more appropriate than concentrations to examine  
 68 the effect of CMS on iron homeostasis at very high altitude. However, since i) most of the iron parameters  
 69 investigated here are proteins of small/moderate size moving between intravascular and extravascular  
 70 spaces, and ii) manipulating intravascular dilution space does not alter plasma concentrations of selected  
 71 markers,<sup>15</sup> we hypothesize that reporting serum concentrations remains a valid approach to compare iron  
 72 homeostasis in the three subpopulations at 5,100 m.

73

#### 74 **Data analyses**

75 As the distribution of hematological data was skewed, data were expressed as median [25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles]  
 76 and non-parametric tests were applied. Kruskal-Wallis tests were performed to analyze i) the effect of  
 77 altitude (sea level; 3,800 m; 5,100 m) in healthy individuals, and ii) the effect of CMS (none; mild; moderate-  
 78 to-severe) at a given altitude, i.e., 3,800 m or 5,100 m. Three CMS categories were used in the present report  
 79 (instead of two in our previous report)<sup>1</sup> to examine the effect of the severity of CMS on iron homeostasis.  
 80 Frequency distributions of systemic inflammation, defined as CRP concentration  $> 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , were compared  
 81 i) between altitudes, including the participants without CMS, and ii) among CMS categories at each altitude,  
 82 using Chi-square tests. To explore the effect of age on the iron parameters in the three cities, multivariable  
 83 linear regression models were performed using age, altitude and CMS severity as covariates ([Supplemental](#)  
 84 [Table 2](#)). All tests were two-sided and a  $P$ -value  $< 0.05$  was considered significant. All statistical analyses were  
 85 performed using R version 4.1.2 for Mac OS (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) and  
 86 GraphPad Prism version 9.3.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

87 **References**

88

- 89 1. Oberholzer L, Lundby C, Stauffer E, et al. Reevaluation of excessive erythrocytosis in diagnosing  
90 chronic mountain sickness in men from the world's highest city. *Blood*. 2020;136(16):1884-1888.
- 91 2. Hanco I, Bailly S, Baillieu S, et al. Excessive Erythrocytosis and Chronic Mountain Sickness in  
92 Dwellers of the Highest City in the World. *Front Physiol*. 2020;11:773.
- 93 3. Champigneulle B, Hanco I, Hamard E, et al. Excessive Erythrocytosis and Chronic Mountain  
94 Sickness in the Highest City in the World: A Longitudinal Study. *Chest*. 2022;161(5):1338-1342.
- 95 4. De Ferrari A, Miranda JJ, Gilman RH, et al. Prevalence, clinical profile, iron status, and subject-  
96 specific traits for excessive erythrocytosis in Andean adults living permanently at 3,825 meters  
97 above sea level. *Chest*. 2014;146(5):1327-1336.
- 98 5. Beall CM. Two routes to functional adaptation: Tibetan and Andean high-altitude natives. *Proc Natl  
99 Acad Sci U S A*. 2007;104 Suppl 1(Suppl 1):8655-8660.
- 100 6. Bailey DM, Culcasi M, Filipponi T, et al. EPR spectroscopic evidence of iron-catalysed free radical  
101 formation in chronic mountain sickness: Dietary causes and vascular consequences. *Free Radic Biol  
102 Med*. 2022;184:99-113.
- 103 7. León-Velarde F, Maggiorini M, Reeves JT, et al. Consensus statement on chronic and subacute high  
104 altitude diseases. *High Altitude Medicine & Biology*. 2005;6(2):147-157.
- 105 8. Wachsmuth N, Soria R, Jimenez J, Schmidt W. Modification of the CO-rebreathing method to  
106 determine haemoglobin mass and blood volume in patients suffering from chronic mountain  
107 sickness. *Exp Physiol*. 2019;104(12):1819-1828.
- 108 9. Siebenmann C, Keiser S, Robach P, Lundby C. CORP: The assessment of total hemoglobin mass by  
109 carbon monoxide rebreathing. *Journal of Applied Physiology*. 2017;123(3):645-654.
- 110 10. Burge CM, Skinner SL. Determination of hemoglobin mass and blood volume with CO: evaluation  
111 and application of a method. *Journal of Applied Physiology*. 1995;79(2):623-631.
- 112 11. Robach P, Gammella E, Recalcati S, et al. Induction of erythroferrone in healthy humans by micro-  
113 dose recombinant erythropoietin or high-altitude exposure. *Haematologica*. 2021;106(2):384-390.
- 114 12. Udali S, Castagna A, Corbella M, et al. Hepcidin and DNA promoter methylation in hepatocellular  
115 carcinoma. *Eur J Clin Invest*. 2018;48(2):e12870.
- 116 13. Willie CK, Patrician A, Hoiland RL, et al. Influence of iron manipulation on hypoxic pulmonary  
117 vasoconstriction and pulmonary reactivity during ascent and acclimatization to 5050 m. *J Physiol*.  
118 2021;599(5):1685-1708.
- 119 14. Cook JD, Flowers CH, Skikne BS. The quantitative assessment of body iron. *Blood*.  
120 2003;101(9):3359-3364.
- 121 15. Dandanell S, Oberholzer L, Keiser S, et al. Effect of alterations in blood volume with bed rest on  
122 glucose tolerance. *J Appl Physiol (1985)*. 2016;121(5):1098-1105.

123

124

125

126 **Supplemental Table 1. Ancestry of study participants at 3,800 m and 5,100 m**

	Sea level (Lima)	3,800 m (Puno)			5,100 m (La Rinconada)		
	No CMS	No CMS	Mild CMS	Mod-Sev CMS	No CMS	Mild CMS	Mod-Sev CMS
N	17	18	5	3	17	24	16
Quechua	5 (29%)	9 (50%)	5 (100%)	3 (100%)	17 (100%)	21 (88%)	15 (94%)
Aymara	4 (24%)	6 (33%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (8%)	0 (0%)
Unknown	8 (47%)	3 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)	1 (6%)

127

128 Distribution of ethnicity, in number of participants and percentage. CMS, chronic mountain sickness.

129 Individuals were categorized with the CMS Qinghai score including the [Hb] criterion (CMS score  $\leq$  5 = no

130 CMS; score of 6 to 10 = mild CMS; score > 10 = moderate-to-severe CMS). CMS, chronic mountain sickness.

131  
 132 **Supplemental table 2. Multivariable linear regression analysis with iron parameters as dependent variables**

	Overall model		Intercept		Altitude					
	R <sup>2</sup>	P	$\beta$	P	$\beta_{3,800\text{ m}}$	P	$\beta_{5,100\text{ m}}$	P	$\beta_{\text{Mild CMS}}$	P
Iron	0.11	0.04	20.30	0.001	4.37	0.08	1.10	0.66	-1.37	0.52
Transferrin saturation	0.04	0.52	27.72	0.001	3.19	0.47	0.37	0.93	-3.39	0.36
Ferritin	0.05	0.38	104.14	0.01	46.30	0.16	16.99	0.60	34.98	0.20
Body Iron	0.15	0.01	16.83	0.001	0.19	0.90	-2.03	0.17	-0.09	0.94
Hepcidin	0.03	0.69	5.10	0.003	-0.17	0.90	-0.03	0.98	-1.13	0.33
Erythroferrone	0.20	0.001	1.46	0.65	0.57	0.83	3.79	0.15	1.90	0.38
sTfR	0.39	0.001	0.15	0.76	0.43	0.28	1.23	0.003	0.11	0.74

133  
 134 For altitude, sea level is the reference group. For CMS, no CMS is the reference group. CMS, chronic mountain sickness.  
 135 severe; sTfR, soluble transferrin receptor.  
 136

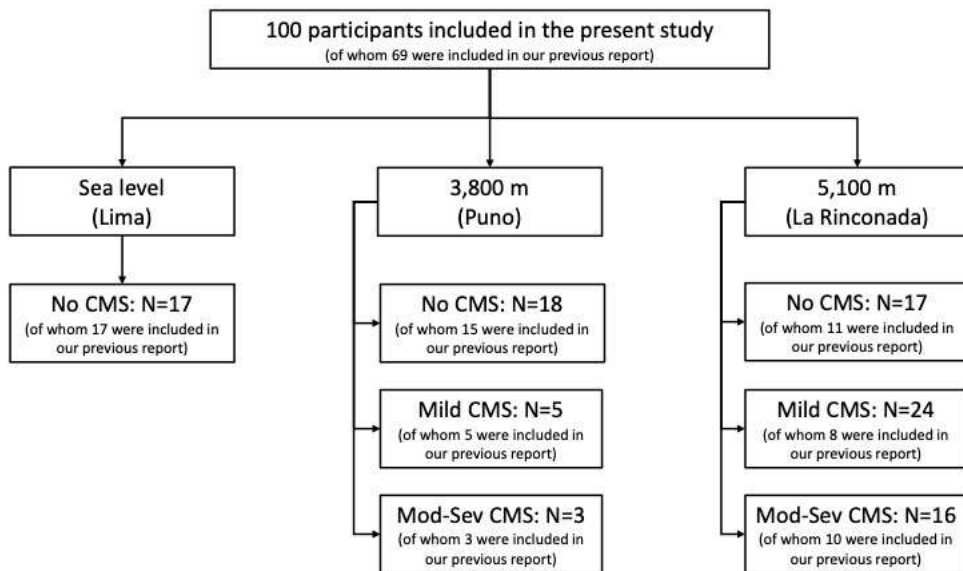
137 **Figure legend**

138

139 **Supplemental figure 1. Flow diagram**

140 Flow diagram for participant inclusion. In each subgroup, N refers to the number of individuals whose iron  
141 metabolism has been assessed for the present study. Numbers in brackets refer to individuals whose  
142 intravascular volume data (not iron data) were previously reported.<sup>1</sup> CMS, chronic mountain sickness; Mod-  
143 Sev, moderate-to-severe.

144



Supplemental Figure 1

## **5 Étude 3 : Impact de l'érythrocytose excessive sur la coagulation chez les habitants de La Rinconada – Une étude observationnelle transversale**

### **5.1 Introduction**

Il est estimé que 5 à 10% de la population vivant en haute altitude est à risque de développer une EE (définie comme une  $[Hb] \geq 21 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$  chez l'homme et  $\geq 19 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$  chez la femme), particulièrement dans les Andes, la population tibétaine semblant relativement protégée sur le plan génétique contre une augmentation démesurée de la  $[Hb]$ .<sup>61,126,137,146</sup> La prévalence de l'EE a été montrée comme augmentant avec l'altitude de résidence, le vieillissement et/ou le temps de résidence en haute altitude.<sup>137,146,252</sup> Ainsi, à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou), nous avons précédemment rapporté une prévalence de l'EE de l'ordre de 44%.<sup>175</sup>

Au niveau de la mer, d'autres causes de polyglobulie, comme les polyglobulies primaires (maladie de Vaquez) ou les polyglobulies secondaires (congénitales ou acquises) ont été montrées comme associées avec une augmentation du risque de thrombose, même si ce risque n'était pas toujours associé avec le niveau de  $[Hb]$ .<sup>254,255</sup> Par ailleurs, d'autres facteurs comme l'exposition hypoxique sont susceptibles de majorer le risque de thrombose dans la maladie de Vaquez.<sup>256</sup> Néanmoins, une augmentation de l'Hct, conduisant à une augmentation de la viscosité sanguine, est susceptible de favoriser la formation de thrombus artériel ou veineux, avec un mécanisme légèrement différent selon le taux de cisaillement, faible dans les veines ou élevé dans les artères.<sup>257</sup> Notre équipe et d'autres ont précédemment montré que les Andéens vivant en haute altitude et souffrant d'EE ou de CMS présentent une augmentation de la viscosité sanguine, à des taux de cisaillement faibles et élevés.<sup>150,151</sup>

Bien qu'il s'agisse d'un facteur de risque thrombotique potentiel, à notre connaissance, l'impact de l'EE sur le risque de thrombose veineuse n'a jamais été étudié dans la population andéenne vivant en haute altitude. Sur le versant artériel, il a été suggéré que l'augmentation de la viscosité sanguine induite par l'EE pourrait augmenter le risque de survenue d'événements

cardio-vasculaires et le risque de survenue d'accidents vasculaires cérébraux, bien que l'association fréquemment rapportée entre EE ou CMS avec les facteurs de risque cardio-vasculaires conventionnels puisse constituer un facteur de confusion.<sup>137,146,217</sup> Par ailleurs, si l'impact d'une exposition hypoxique aiguë en haute altitude sur l'hémostase a été largement étudié chez les habitants de plaine,<sup>215</sup> l'impact potentiel de la vie permanente en haute altitude, ainsi que l'impact potentiel de l'EE sur le système hémostatique, restent peu étudiés à notre connaissance.<sup>190,218,219,258,259</sup>

En particulier, deux études récemment conduites dans la population andéenne de haute altitude ont rapporté des résultats potentiellement contradictoires. Dans une étude visant à explorer la coagulation et la fibrinolyse, chez des patients présentant une EE, conduite à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou), il n'était pas retrouvé d'arguments biologiques en faveur d'un état d'hypercoagulabilité.<sup>218</sup> À l'inverse, dans une étude préliminaire conduite à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou), nous avons rapporté des temps de saignement et de coagulation significativement plus courts chez les participants présentant une EE, en comparaison aux participants sans EE, en faveur de l'existence d'un état pro-coagulant chez les habitants de haute altitude souffrant d'EE.<sup>219</sup> Le manque d'études visant à étudier l'impact de l'EE sur l'hémostase peut s'expliquer au moins en partie par la difficulté de mener des tests biologiques complexes dans les zones reculées de haute altitude offrant des installations de recherche très limitées. Dans des environnements présentant de telles contraintes, l'utilisation de tests d'hémostase délocalisables, tels que les tests viscoélastiques, pourrait permettre d'évaluer facilement sur le terrain la dynamique globale de la coagulation du sang total.<sup>220</sup> Ainsi, la thromboélastométrie rotative et la thromboélastographie ont déjà été utilisées avec succès sur le terrain en haute altitude, jusqu'à 5300 m, pour évaluer la cinétique de formation du caillot, chez des habitants de plaine exposés de manière aiguë à la haute altitude,<sup>260,261</sup> mais jamais chez des habitants de haute altitude en bonne santé (c'est à dire considérés comme adaptés à la vie permanente en haute altitude) ou souffrant d'EE (c'est à dire présentant une maladaptation à vie permanente en haute altitude).

Sur la base des considérations ci-dessus, nous avons émis l'hypothèse que les Andéens vivant de manière permanente au-dessus de 5000 m, et souffrant d'EE, étaient susceptibles de présenter un état d'hypercoagulabilité, en comparaison avec ceux ne présentant pas d'EE et en comparaison à des habitants de plaine en bonne santé. Pour tester cette hypothèse, nous avons

réalisé une étude transversale à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou), afin d'évaluer la coagulation globale sur sang total en utilisant la thromboélastométrie rotative (ROTEM®), chez des habitants de haute altitude, souffrant ou non d'EE. Afin d'avoir un aperçu plus précis de la coagulation dans cette population, nous avons complété la réalisation de ce test de coagulation globale par des mesures plasmatiques des facteurs et des inhibiteurs de la coagulation, ainsi que par la réalisation d'un test de génération de thrombine.

## 5.2 Résumé de l'étude

**Introduction :** L'érythrocytose excessive (EE, définie comme une concentration d'hémoglobine ([Hb])  $\geq 21 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$  chez l'homme) est la clé de voûte du mal chronique des montagnes, un syndrome maladaptatif touchant les habitants de haute altitude, en particulier dans les Andes. L'impact potentiel de l'EE sur la coagulation reste peu étudié dans cette population et un effet pro-thrombotique de l'EE est suggéré. L'objectif de cette étude était d'étudier le profil de coagulation chez des habitants de haute altitude, vivant de manière permanente à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou) et souffrant d'EE.

**Méthodes :** Nous avons conduit une étude transversale, incluant 10 résidents de basse altitude (*lowlanders*, LL) et 45 habitants de haute altitude (*highlanders*, HL), résidents permanents à La Rinconada, présentant ou non une EE (HL EE+ et HL EE-). Une mesure de la coagulation sur sang total par thromboélastométrie (ROTEM® delta, Werfen, France) a été réalisée à hémocrite (Hct) natif pour chaque participant, et à Hct corrigé à 40%, par dilution autologue en utilisant du plasma pauvre en plaquettes (PPP), chez les HL seulement. Les tests ROTEM suivants ont été utilisés : EXTEM (évaluation de la voie extrinsèque), INTEM (évaluation de la voie intrinsèque), FIBTEM (évaluation de la participation du fibrinogène à la fermeté du caillot) et APTTEM (détection d'une éventuelle fibrinolyse). Les paramètres ROTEM suivants ont été particulièrement considérés : CT (*clotting time*, temps d'initiation de la coagulation, en secondes) et A20 (amplitude à 20 min, correspondant à la fermeté du caillot, en mm). La mesure ROTEM a été complétée par des dosages plasmatiques des facteurs et des inhibiteurs de la coagulation, ainsi que par un test de génération de thrombine (TGT), réalisés sur des échantillons de PPP. Des comparaisons ont été réalisées entre les valeurs obtenues chez les LL, les HL EE- et les HL EE+. Les valeurs ROTEM réalisées à Hct corrigé chez les HL EE+ et HL EE- ont été comparées aux valeurs à Hct natif chez les LL.

**Résultats :** Sur les tests ROTEM réalisés à Hct natif, les HL EE+ présentaient un CT plus long, ainsi qu'une A20 plus faible, en comparaison aux HL EE- et aux LL, en EXTEM, INTEM et FIBTEM ( $p < 0,01$  pour toutes les comparaisons), en faveur d'un profil hypocoagulable chez les HL EE+, en comparaison aux HL EE- et LL. L'APTEM ne retrouvait pas d'hyperfibrinolyse dans les trois groupes.

Sur les tests ROTEM réalisés à Hct corrigé à 40%, seulement une légère élongation du CT persistait en EXTEM chez les HL EE+, en comparaison aux HL EE- et aux LL, alors que les CT étaient similaires en INTEM et FIBTEM ( $p > 0,05$ ) ; à Hct corrigé à 40%, l'A20 restait significativement plus faible chez les HL EE+ vs. les HL EE- et les LL en EXTEM et INTEM ( $p < 0,05$ ), alors qu'en FIBTEM, il n'était plus observé de différence entre les trois groupes concernant la fermeté du caillot à 20 min.

Les taux plasmatiques des facteurs et des inhibiteurs de la coagulation étaient globalement similaires entre les trois groupes. Sur le TGT, la quantité de thrombine générée était similaire entre les trois groupes ( $p > 0,05$ ) ; seul le temps de latence était significativement plus élevé chez les HL EE+ vs. les LL ( $2,9 \pm 0,4$  vs.  $2,4 \pm 0,3$  s. ;  $p = 0,01$ ).

**Conclusion :** Dans cette étude, les HL EE+ ne présentaient pas de profil hypercoagulable. A contrario, les résultats du ROTEM suggéraient un profil hypocoagulable, partiellement corrigé après normalisation de l'Hct, pouvant évoquer un effet de dilution des facteurs de la coagulation et du fibrinogène par le volume des globules rouges. La relevance clinique de ces résultats (en termes de risque thrombotique) dans le contexte de polyglobulie reste à déterminer.

### 5.3 Manuscrit soumis et contribution personnelle

Le manuscrit suivant a été soumis en mai 2023 à la revue *Thrombosis and Haemostasis* (*impact factor* 2021 : 6.68 ; catégorie SIGAPS B) et est en cours d'évaluation. Le manuscrit soumis est reproduit ci-dessous, accompagné de son matériel méthodologique annexe. Ma contribution personnelle à ce travail a été la suivante :

- Conception de l'étude.
- Réalisation des expérimentations sur place à La Rinconada.
- Analyse statistique et interprétation des données.
- Écriture de la première version du manuscrit.

# Coagulation pattern in highlanders with excessive erythrocytosis permanently living at 5,100 m

## Running head: Coagulation in the highest city in the world

Benoit Champigneulle<sup>1,2\*</sup>, François Caton<sup>3</sup>, Landry Seyve<sup>4</sup>, Émeric Stauffer<sup>5,6,7</sup>, Aurélien Pichon<sup>8</sup>, Julien V. Brugniaux<sup>1</sup>, Michael Furian<sup>1</sup>, Ivan Hancoco<sup>1</sup>, Blandine Deschamps<sup>1</sup>, Lars Kaestner<sup>9</sup>, Paul Robach<sup>10</sup>, Philippe Connes<sup>5,6</sup>, Pierre Bouzat<sup>2,11</sup>, Benoit Polack<sup>12</sup>, Raphael Marlu<sup>4,12</sup>, Samuel Verges<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univ. Grenoble Alpes, Inserm, CHU Grenoble Alpes, HP2, 38000 Grenoble, France.

<sup>2</sup> Department of Anesthesia and Critical Care, CHU Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France.

<sup>3</sup> Univ. Grenoble Alpes, CNRS, LRP, 38000 Grenoble, France.

<sup>4</sup> Hemostasis Laboratory, Grenoble University Hospital, Grenoble, France.

<sup>5</sup> Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (LIBM) EA7424, Team "Vascular Biology and Red Blood Cell", Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France.

<sup>6</sup> Laboratoire d'Excellence du Globule Rouge (Labex GR-Ex), PRES Sorbonne, Paris, France.

<sup>7</sup> Exploration Fonctionnelle Respiratoire, Médecine du Sport et de l'Activité Physique, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Croix Rousse, Lyon, France.

<sup>8</sup> Université de Poitiers, Laboratoire Move UR 20296, STAPS, Poitiers, France.

<sup>9</sup> Saarland University, Homburg, Germany.

<sup>10</sup> National School for Mountain Sports, Site of the National School for Skiing and Mountaineering (ENSA), Chamonix, France.

<sup>11</sup> Univ. Grenoble Alpes, Inserm, CHU Grenoble Alpes, GIN, 38000 Grenoble, France.

<sup>12</sup> Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CHU Grenoble Alpes, TIMC-IMAG, 38000 Grenoble, France.

### \* Corresponding author:

Dr. Benoit Champigneulle (ORCID 0000-0003-0922-5102)

Laboratoire HP2 (U1300 INSERM), Univ. Grenoble Alpes

UM Sports Pathologies, Hôpital Sud, CS 10217, 38043 Grenoble Cedex 9 - France

Tel: +33 4 76 76 68 60 - Fax: +33 4 76 76 89 21 - E-mail: BChampigneulle@chu-grenoble.fr

**Word count: 4786; References: 48; Table: 1; Figure: 4; Abstract word count: 249.**

### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

BC, FC, ES, AP, JVB, PR, PC, PB, BP, RM and SV designed the study. BC, LS, ES, AP, JVB, MF, IH, BD, LK performed the experimentations and/or acquired the data. BC performed the statistical analysis. BC, FC, LS, BP, RM and SV analyzed and interpreted the data. BC and SV wrote the manuscript; FC, LS, ES, AP, JVB, MF, IH, BD, LK, PR, PC, PB, BP and RM revised it critically for important intellectual content. All authors gave final approval and agreed to be accountable for all aspects of work ensuring integrity and accuracy.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

The ROTEM® delta analyzer used for this study was kindly provided by Werfen (Werfen, Le-Pré-Saint-Gervais, France). However, the sponsor had no further involvement in any step of the study (study design, collection, and analysis of the data or writing of the manuscript).

The authors would like to thank the volunteers for their commitment and time invested in this study as well as the medical students of the scientific association of medical students from the Altiplano University (Puno, Peru) who actively contributed to the research program implemented in La Rinconada.

### **CONFLICTS OF INTEREST**

The authors declare no competing financial interest.

### **FUNDING**

This study was supported by the Grenoble Alpes University foundation, the “Fonds de dotation AGIR pour les maladies chroniques”, the Air Liquide Foundation and by the French National Research Agency (ANR-12-TECS-0010) in the framework of the “Investissements d’avenir” program (ANR-15-IDEX-02).

## ABSTRACT

**Background:** Excessive erythrocytosis (EE, defined as a hemoglobin level  $\geq 21 \text{ g} \cdot \text{dL}^{-1}$  in men) is the keystone of chronic mountain sickness, a maladaptive syndrome affecting highlanders. How EE impacts the coagulation and could promote thrombosis remains to be elucidated.

**Objectives:** To assess the coagulation pattern of Andean highlanders with (HL EE+) and without (HL EE-) EE.

**Patients/Methods:** Whole-blood coagulation was assessed using thromboelastometry (ROTEM) in 30 HL EE+ and 15 HL EE- in La Rinconada (Peru, 5,100-5,300m), at native hematocrit (Hct) and then after in vitro Hct correction to 40% using autologous platelet-poor plasma (EXTEM, INTEM, APTEM and FIBTEM assays). Data at native and corrected Hct were compared to measurements performed at native Hct in 10 lowlanders (LL) at sea level. ROTEM testing was completed by measurements of clotting factor and inhibitor levels, and thrombin generation assays.

**Results:** HL EE+ exhibited weaker clot strength (*i.e.*, smaller amplitude at 20 min, A20) than HL EE- and LL in all assays (all  $p < 0.01$ ). At corrected Hct, differences in A20 persisted between groups in EXTEM and INTEM (all  $p < 0.01$ ) but not in FIBTEM ( $p > 0.05$ ). Plasma clotting factor and inhibitor levels were almost unchanged between groups. HL EE+ exhibited a similar thrombin generation pattern than HL EE- and LL except for a slightly longer lag time ( $p < 0.05$  vs. LL).

**Conclusions:** HL EE+ did not exhibit a hypercoagulable state. Oppositely, ROTEM results even suggested a hypocoagulable profile. The clinical significance of these biological findings in the context of polycythemia and potential implications remain to be clarified.

**KEYWORDS:** Altitude Sickness; Blood Coagulation; Hypoxia; Polycythemia; Thromboelastometry.

## INTRODUCTION

More than 80 millions highlanders (HL), permanently living in high-altitude (HA) areas (*i.e.*, above 2,500 m) worldwide, are chronically exposed to hypobaric hypoxia.<sup>21</sup> High-altitude native HL, descendants of populations living at HA for thousands of years, have developed genetic adaptations that allow them to cope with their hypoxic environment.<sup>130,262</sup> Among them, different adaptive patterns have been depicted among the Andean and Tibetan populations, representing the most studied HA populations.<sup>10,114</sup> Indeed, Andean populations exhibit higher hemoglobin concentration ([Hb]) levels than Tibetans<sup>61</sup> and seem more susceptible to develop chronic mountain sickness (CMS),<sup>137,146</sup> a maladaptive syndrome characterized by symptomatic excessive erythrocytosis (EE, defined by an international consensus as a [Hb]  $\geq 21$  g·dL<sup>-1</sup> in men and  $\geq 19$  g·dL<sup>-1</sup> in women<sup>126</sup>) and severe hypoxemia, in association with hyperviscosity symptoms.<sup>151</sup> It is estimated that 5-10% of the worldwide HL population suffers from EE, and thus, are at risk of CMS, which prevalence increases with the altitude of residence and with ageing and/or time spent at HA.<sup>137,146,252</sup> For instance, we previously reported a prevalence of EE up to 44% in La Rinconada,<sup>175</sup> the highest city in the world (5,100-5,300 m), a gold-mining city in southern Peru with an estimated population of 50,000 – 70,000.<sup>20</sup>

At sea level, other causes of polycythemia such primary polycythemia (polycythemia vera (PV) for instance) and secondary polycythemia (congenital or acquired) have been associated with an increased risk of thrombosis,<sup>254,255</sup> albeit this risk was not always associated with the [Hb] level.<sup>255,263</sup> Other factors such as hypoxic exposure have been associated with an increased thrombotic risk in PV.<sup>256</sup> Moreover, high hematocrit (Hct) leads to increased whole-blood viscosity and may promote venous and arterial thrombosis, with slightly different hemostasis mechanisms according to low (veins) or high (arteries) shear rates.<sup>257</sup> Hence, we and others have previously shown that Andean HL suffering from EE and CMS exhibit high whole-blood viscosity, at both low and high shear rates.<sup>150,151</sup>

Despite being a potential thrombotic factor, to our knowledge, the impact of EE on venous thrombosis risk has never been investigated in Andean HL. On the arterial side, it has been suggested that the increased blood viscosity caused by altitude polycythemia may increase the risk of cardiovascular events and strokes, albeit the frequent association of EE and CMS with common cardiovascular risk factors may be a confounding factor.<sup>137,146,217</sup> Furthermore, while the impact of acute altitude exposure on hemostasis in lowlanders (LL) ascending to HA has

been extensively studied and recently reviewed,<sup>215</sup> the impact of permanent residence at HA, as well as the potential repercussions of EE on the hemostasis system, remain poorly investigated.<sup>190,218,219,258,259</sup>

Especially, two recent studies in Andean HL reported possible conflicting results. A coagulation-fibrinolytic axis investigation conducted in Cerro de Pasco (~4,300 m, Peru) did not support a hypercoagulable pattern in EE HL,<sup>218</sup> while we previously reported, in a preliminary study conducted in La Rinconada, lower bleeding and clotting times in HL with EE, compared to those without EE.<sup>219</sup> Lack of studies aiming at investigating the impact of EE on hemostasis in HL may be at least partially explained by the difficulty to conduct complex biological assays in HA remote areas, offering very limited research facilities.<sup>219</sup> In a constrained environment such as La Rinconada, hemostatic point-of-care devices, mainly viscoelastic hemostatic assays (VHA), offer the possibility to easily assess the global dynamic of whole-blood clotting in the field.<sup>220</sup> Thereby, thromboelastometry (TEM) and thromboelastography (TEG) have been previously successfully used in the field, up to 5,300 m, to assess clot kinetic in LL acutely exposed to HA,<sup>260,261</sup> but never in healthy HL (*i.e.*, well-adapted to HA) or HL suffering from maladaptation (*i.e.*, with EE).

Based on the above considerations, we hypothesized that Andeans HL with EE, permanently living at extreme altitude above 5,000 m, may present a hypercoagulable state compared to healthy HL and LL. To test this hypothesis, we performed a field study in La Rinconada (5,100-5,300 m), assessing global coagulation using TEM, aiming to assess the potential impact of EE on coagulation in native HL permanently living at HA. In order to further examine the coagulation cascade in Andeans HL, we completed this whole-blood coagulation testing by measurements of clotting factor and inhibitor levels as well as thrombin generation assay (TGA).

## **METHODS**

### **Study overview and ethical approval**

To investigate the impact of both permanent living at HA in healthy native Andeans HL, and polycythemia in maladapted HL suffering from EE on coagulation, we conducted a cross-sectional study within the Expedition5300 research program framework.<sup>20</sup> This study was approved by the ethic committee of the Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima, Peru, IRB number: 00003251) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All participants were fully informed about the study in their native language and signed a written informed consent before inclusion.

### **Experimental design**

*Highland participants.* Hemostasis testing was performed in 45 male HL, inhabitants of La Rinconada (5,100 m, Peru) for more than 3 years (median residency time: 15 [7-20] years), and natives from the altiplano area (*i.e.*, >3,500 m). Highland participants were recruited among dwellers who spontaneously reported to our temporary medical research laboratory established in the mining cooperative building. None of the HL did take any anticoagulant or antiaggregant therapies and were exempt from medical history of cardiovascular, metabolic and respiratory diseases that could induce secondary polycythemia and interfere with a diagnosis of EE and CMS<sup>126</sup>. None of them declared excessive alcohol consumption (*i.e.*, more than 2 units by day). All of them were professionally active, mainly involved in mining activity (for 33/45, 73%).

*Lowland participants.* The same hemostasis testing was performed in a sea-level control group including 10 healthy Caucasian lowlanders (LL) at low altitude (Grenoble, France, 210 m). They were researchers from the Expedition5300 research team and measurements were performed 1 week before travelling to La Rinconada, without altitude exposure in the previous months. No LL participants had a significant medical history (including known prothrombotic disease or bleeding diathesis) and did not take any regular medication (except low-dose combined estrogen-progestin oral contraceptive for one LL female).

### **Experimental measures**

#### **Clinical assessment of highlanders**

Demographic and clinical data were recorded during an initial medical consultation. Highlanders were categorized as with (HL EE+) or without (HL EE-) EE, according to the [Hb]

conventional threshold of 21 g·dL<sup>-1</sup>.<sup>126</sup> CMS diagnosis was retained in case of Qinghai CMS score  $\geq 6$ , including the presence of EE. This score is based on the scoring of seven clinical signs or symptoms (breathlessness and/or palpitations, sleep disturbance, cyanosis, venous dilatation, paresthesia, headache, tinnitus) from 0 (absence of symptom) to 3 (severe symptom) and the absence or presence of EE (adding 3 points to the symptom subscore). Severity of CMS was then defined as mild (CMS score: 6-10), moderate (CMS score: 11-14) or severe (CMS score  $\geq 15$ ).<sup>126</sup> A validated questionnaire, translated in Spanish, was used to assess any history of venous thromboembolism.<sup>264</sup>

### **Blood samples: collection and storage**

All blood samples were collected through a venous antecubital puncture performed at rest in supine position, using a 18G or 21G (for LL at low altitude) butterfly needle system and vacutainer tubes (Becton-Dickinson, Le Pont-de-Claix, France), containing 0.109 M (3.2%) trisodium citrate for the hemostasis assays or EDTA anticoagulant for complete blood count (CBC). Because the range of Hct in La Rinconada goes above 80%,<sup>175</sup> the amount of trisodium citrate had to be significantly adjusted to avoid excess citrate which would artificially produce hypocoagulable profiles.<sup>265</sup> Using the screening Hct value measured during the inclusion visit, the appropriate volume of citrate was removed from the blood tube using a tuberculin syringe (see Supplementary Methods and Figure S1 for further details). Attention was paid to minimize the tourniquet time, to discard the first volume of blood collected and to collect first the citrated coagulation tubes.<sup>265</sup> All tubes used for the analyses were fully filled and gently mixed after collection. Some tubes were promptly used for on-site analyses (*i.e.*, for TEM and CBC). From part of the coagulation tubes, platelet-poor plasma (PPP) was prepared by double centrifugation (2000g for 10 min with intermediate settling) at ambient temperature, then used to hemodilute ROTEM assays (see below) or was immediately snap frozen in liquid nitrogen, then stored at -80°C and shipped to France in a temperature-controlled packaging with dry ice for the subsequent complementary hemostasis assays (see below).

### **Thromboelastometry**

Whole-blood VHA were performed using a rotational TEM device (ROTEM® delta, Werfen, Le-Pré-Saint-Gervais, France) on citrated blood samples, collected as detailed above. The ROTEM® axis is alternately rotating back and forth by 4.75° twelve times per minute and at a shear rate of 0.1 s<sup>-1</sup>. All TEM measurements were conducted at 37°C, within four hours of blood sampling, and all citrated blood tubes were preheated in the dedicated preheating

station of the system during 5-10 min before analyzing according to the manufacturer's instructions. For each participant, using the different available channels of the ROTEM, four standard assays (EXTEM, INTEM, FIBTEM and APTTEM), which allow to explore different coagulation pathways (the extrinsic and intrinsic pathways, the fibrinogen contribution to the clot stability and the detection of hyperfibrinolysis, respectively), after recalcification, were conducted simultaneously.<sup>220</sup> Quality control tests were performed weekly (at both altitudes) during the study, using INTEM and EXTEM reagents, and all measured values remained in the targeted ranges.

Each ROTEM assay was conducted in order to obtain an A20 clot amplitude (*i.e.*, the clot amplitude at 20 min) and the preceding conventional parameters were recorded from the generated TEMogram: CT (clotting time), CFT (clotting formation time), alpha angle and A10 (clot amplitude at 10 min).<sup>220</sup> A more detailed overview of the ROTEM assays and parameters as well as findings' interpretation is provided in the supplementary methods. Sea-level reference values were obtained from Lang et al.<sup>266</sup>

Because Hct level has been shown to impact VHA (with a decreasing clot firmness when Hct increases),<sup>267,268</sup> and thus to allow comparison between the different groups of participants (LL, HL EE- and HL EE+), the TEM assays were conducted first on a whole blood sample at native Hct, then after correction of Hct at ~40% using autologous PPP for hemodilution for 42 out of 45 HL participants (three TEM assays at corrected Hct failed for technical reasons); the post-dilution measured (mean  $\pm$  SD) Hct was  $40 \pm 4\%$ .

### **Hematology assays**

*Hemoglobin concentration and hematocrit.* Hemoglobin concentration was measured in duplicate from a venous blood sample (ABL80, Radiometer, Copenhagen, Denmark). Hematocrit was measured in duplicate from a venous blood sample, using the microcentrifuge method (Sigma 1-14, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Germany).

*Platelet count.* At low altitude, for LL, platelet count and mean platelet volume (MPV) were obtained from complete blood count performed using a Sysmex XN-10 analyzer (Sysmex, Kobe, Japan). At HA, complete blood counts were obtained for all HL, after daily car-transportation of the EDTA tubes to the closest local laboratory (Puno, Peru) for analysis (BC-51250 analyzer, Mindray, Shenzhen, China) with a maximal delay between blood sampling and analysis of less than 30 hours, an acceptable delay in a remote HA area.<sup>261</sup>

## Complementary hemostasis assays

All complementary hemostasis assays were performed on frozen plasma samples (see preparation details above), previously stored at -80°C until analysis, which were thawed once at 37°C in a water-bath for 5 min. The panel of hemostasis assays included routine assays (prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), fibrinogen level, clotting factors and inhibitors) as well as TGA.

*Routine hemostasis assays.* Most of them were performed using a STA-R Max 3 coagulometer (Stago, Asnières, France) using the following reagents: STA®-NeoPTimal (Stago) for PT, STA®-PTTA (Stago) for aPTT and STA®-Liquid Fib (Stago) for fibrinogen activity (Clauss method). Prothrombin (FII), FV, FX levels were determined with STA®-NeoPTimal and, respectively, with STA®-Deficient II (Stago), STA®-Deficient V (Stago), and STA®-Deficient X (Stago). FVII level was determined with Dade® Innovin® (Siemens, Marburg, Germany) and with STA®-Deficient VII (Stago). FVIII, FIX, FXI, and FXII levels were determined with STA®-CK Prest® (Stago) and, respectively, with STA®-Immunodef VIII (Stago), STA®-Immunodef IX (Stago), STA®-Immunodef XI (Stago), and STA®-Immunodef XII (Stago). Antithrombin activity (AT), protein C activity (PC) and free protein S antigen (PS) were determined, respectively, with STA®-Stachrom® Antithrombin (Stago), STA®-Stachrom® Protein C activity, and STA®-Liatest® Free Protein S (Stago). D-dimers were determined with STA®-Liatest D-Di (Stago). Photometric determination of FXIII activity was done using the Berichrom® Factor XIII assay (Siemens).

To consider the “functional” fibrinogen concentration according to the potential dilution effect of red blood cells in HL, a whole-blood fibrinogen concentration (WBFC) was calculated using the following formula:  $WBFC (g \cdot L^{-1}) = (1-Hct) \times \text{Plasma fibrinogen } (g \cdot L^{-1})$ , as described elsewhere.<sup>269–271</sup>

*Thrombin generation.* TGA was performed using a calibrated automated thrombogram assay (Thrombinoscope BV, Maastricht, Netherlands) on an automated fluorometer (Fluoroscan Ascent, ThermoLab Systems, Franklin, USA). Coagulation was triggered by 5 pM of TF and 4 μM of pro-coagulant phospholipids (PL) (PPP Reagent® [Thrombinoscope BV]). All TGA were run in triplicate in 96-well plates under standard conditions. Briefly, 80 μL of PPP was mixed with 20 μL of TF/PL. Plates were incubated for 10 min at 37°C in the automated fluorimeter before adding the fluorogenic substrate (ZGGR-AMC) and calcium (FluCa Kit®, Stago, France). Raw data were analyzed using Thrombinoscope software, V5.0 (Thrombinoscope BV). The lag time (time to thrombin generation start, min), the time to peak (min), the peak height (nM) and the endogenous thrombin potential (ETP, nM·min) were

recorded.<sup>272</sup> Due to a reduced amount of available PPP, TGA was not performed in 1/10 (10%) LL, 2/15 (13%) HL EE- and 13/30 (43%) HL EE+.

### **Statistical analysis**

Categorical data were expressed as absolute count and percentage (%). Continuous data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or in median [25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles], dependent on whether data were normally distributed or not. One-way analysis of variance (ANOVA) or a Kruskal-Wallis test was conducted to assess differences between the 3 groups of participants (LL, HL EE- and HL EE+); in case of significant main effect, post-hoc pairwise comparisons were performed using a Tukey's HSD test or a Dunn's test with Bonferroni correction, as appropriate. As many ROTEM parameters exhibited skewed distributions, all were expressed and analyzed as non-parametric variables. Two statistical analysis were conducted on the ROTEM data: firstly, test results were compared at native Hct between LL, HL EE- and HL EE+; secondly, results obtained on samples at corrected Hct in HL EE- and HL EE+ were compared with LL results (only conducted at native Hct, since all LL Hct were lower than 50%). Exploratory association analyses were conducted with correlation analysis using Spearman's rank correlation coefficients ( $\rho$ ) or univariate linear regression ( $R^2$ ) when appropriate.

All tests were two-sided and a  $p$ -value  $<0.05$  was considered significant. All statistical analyses were performed using R software (version 4.2.2, The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) and GraphPad Prism (version 9.5.0, GraphPad Software, Boston, MA, USA).

## RESULTS

### General characteristics

The demographic characteristics of the 55 participants are summarized in Table 1. Among the 45 HL included, 15 (33%) participants were classified as HL EE- and 30 (67%) were classified as HL EE+. Almost all HL EE+ (93%) suffered from CMS, mainly of mild severity. By definition, HL EE+ presented the highest [Hb] and Hct values among the groups; they also exhibited a lower platelet count than HL EE- and a higher fibrinogen level than LL (Table 1). In HL (EE+ and EE-) participants, platelet count showed a negative linear relationship with [Hb] ( $R^2=0.26$ ,  $p<0.001$ , Figure S2A), as well as a negative relationship with MPV ( $R^2=0.20$ ,  $p=0.002$ , Figure S2B). When considering the WBFC, HL EE+ exhibited the lowest fibrinogen values among the groups. No difference was highlighted between the 3 groups regarding first-line hemostasis assays (*i.e.*, aPTT, PT and D-dimers, Table 1). According to the dedicated questionnaire, no history of confirmed venous thromboembolism was identified in HL participants.

### Clotting factors and inhibitors

Plasma clotting factor and inhibitor levels, with individual values, are presented in Figure 1. Only factor XII and IX were significantly lower and higher, respectively, in both HL groups versus LL. Mean values of all factors and inhibitors were however within or close to the normal ranges (Figure 1).

### ROTEM measurements

Main results from ROTEM assays are depicted in Figure 2 and all assay results are reported in Tables S1 and S2. At native Hct, HL EE+ exhibited a hypocoagulable profile compared to the HL EE- and LL groups, with a significant delayed clot initiation with an increased CT in EXTEM, INTEM and FIBTEM (Figure 2, A-C), a significant decrease in clot formation (as shown through a decreased alpha angle and increased CFT in EXTEM and INTEM, Table S1), and a significantly lower clot firmness in A10 (Table S1) and A20 (Figure 2, D-F), in EXTEM, INTEM and FIBTEM. Comparisons between EXTEM and APTEM assays did not support hyperfibrinolysis among the groups (Table S1).

After Hct correction at 40% in HL, difference in ROTEM profiles between groups were modified regarding the EXTEM and INTEM assays: CT became similar between groups in INTEM (Figure 2B), whereas it remained slightly increased in HL EE+ and HL EE- versus LL

in EXTEM (Figure 2A); clot strength remained significantly lower in HL EE+, in A10 versus LL (Table S2) and in A20 versus both HL EE- and LL (Figure 2 D-E). Conversely, in FIBTEM assays, no persistent clot strength difference in A10 (Table S2) and A20 (Figure 2F) was observed between groups.

No significant correlation was observed neither between CT in EXTEM and PT ( $\rho=0.09$ ,  $p=0.52$ ), nor between CT in INTEM and aPTT ( $\rho=0.23$ ,  $p=0.10$ ). Conversely, in HL at corrected Hct, CT in INTEM was moderately correlated with aPTT ( $\rho=0.53$ ,  $p<0.001$ ). Clot strength (A20) in EXTEM and INTEM were moderately correlated with the platelet count ( $\rho=0.50$  and  $\rho=0.52$ , respectively,  $p<0.001$ ). In HL participants, CT was strongly correlated with the Hct at native Hct ( $\rho=0.87$  in EXTEM and  $\rho=0.80$  in INTEM,  $p<0.001$ ), whereas at corrected Hct, no significant correlation remained between CT and Hct ( $\rho=0.12$  in EXTEM and  $\rho=0.13$  in INTEM,  $p>0.05$ ). Regarding the association between clot strength in FIBTEM and fibrinogen concentration, the FIBTEM A20 showed a significant linear relationship with WBFC only ( $R^2=0.61$ ,  $p<0.001$ ), but not with the plasma concentration (Figure 3).

### **Thrombin generation assay**

Results of the TGA are displayed in Figure 4. Highlanders exhibited similar ETP levels and peak height to LL (Figures 4D and 4E). Nevertheless, the lag time was slightly increased in HL EE+ versus LL ( $p=0.01$ ; Figure 4B), also concordant with a trend for longer time to peak (global effect  $p=0.051$ ; Figure 4C). In the overall population, lag time was significantly correlated with CT in EXTEM ( $\rho=0.44$ ,  $p=0.005$ ) and in INTEM ( $\rho=0.46$ ,  $p=0.003$ ). Similar correlations were observed between time to peak and CT in EXTEM ( $\rho=0.40$ ,  $p=0.01$ ) and in INTEM ( $\rho=0.39$ ,  $p=0.01$ ). In HL, when considering ROTEM assays performed at corrected Hct, lag time remained significantly correlated with CT in EXTEM and INTEM ( $\rho=0.43$  and  $\rho=0.39$ , respectively;  $p<0.05$ ).

## DISCUSSION

In this observational study, using a hemostasis testing array including TEM assays conducted in the field, we assessed the coagulation pattern of high-altitude native highlanders permanently living above 5,000 m, focusing on those suffering from maladaptation, *i.e.*, with excessive erythrocytosis. The main findings of this study were that 1) HL EE+ exhibited lower platelet count than HL EE- and higher plasma fibrinogen concentration than LL, albeit this later difference was reversed when considering whole-blood concentration, 2) HL exhibited very few difference regarding clotting factor and inhibitor levels compared to LL, 3) HL EE+ exhibited a hypocoagulable ROTEM profile compared to HL EE- and LL, partially corrected after hemodilution with PPP, 4) thrombin generation pattern obtained with PPP was not different between HL EE+, HL EE- and LL participants, except for a slightly longer lag time in HL EE+. Taken together, in contrast to our hypothesis, the overall results do not suggest a hypercoagulable state in Andeans highlanders with excessive erythrocytosis permanently living at extreme altitude.

The most striking result observed in our cross-sectional study concerns the apparently hypocoagulable ROTEM profile observed in HL EE+ at native Hct, including a delayed clot initiation and a lower clot firmness in all reagent assays. To our knowledge, this is the first study providing VHA (and TGA) to evaluate the coagulation status of HL with and without EE. In the subgroup of PV patients in a study assessing the coagulation profile in myeloproliferative disorders, Tripodi et al.<sup>273</sup> reported lower ETP in TGA (using PPP) as well as similar CFT and maximum clot firmness in ROTEM INTEM assays compared to healthy controls. Conversely, others reported a hypercoagulable ROTEM profile in PV patients with an increased maximum clot firmness and a shorter CFT in EXTEM and INTEM<sup>274</sup> ; however, these PV patients exhibited lower Hct or [Hb] levels than in the present study and other factors than the inherent viscosity are implicated in the PV prothrombotic tendency.<sup>275,276</sup>

Overall, the HL EE+ included in the present study presented similar hypocoagulable ROTEM profiles to what is known in chronically hypoxemic patients at sea level suffering from uncorrected cyanotic congenital heart disease (CCHD), who had almost similar polycythemia level to HL EE+.<sup>270,271,277</sup> Like the HL EE+ participants included in the present study, CCHD patients had higher plasma fibrinogen concentrations than controls, but lower WBFC<sup>270</sup> and exhibited notably lower clot amplitude in FIBTEM assays, in which the clot firmness mainly

depends on fibrinogen, as platelets are inhibited by cytochalasin D.<sup>270,271,277</sup> It has been hypothesized that the dilution of the total amount of fibrinogen in whole blood induced by high Hct may explain the lower FIBTEM clot strength.<sup>270</sup> Data in the present study corroborate this hypothesis: after Hct correction at 40% using unmanipulated PPP (that necessarily leads to an increase in WBFC), we observed a normalization of FIBTEM A20 in HL EE+ to HL EE- and LL levels; furthermore, at native Hct the FIBTEM A20 was significantly correlated with WBFC only and not with plasma fibrinogen. Higher correlations between FIBTEM A20 and WBFC rather than with plasma fibrinogen have been previously reported.<sup>269–271</sup> Other potential mechanisms underlying the lower FIBTEM clot strength in HL EE+ may include a qualitative decrease of the fibrin network secondary to the incorporation of a large amount of red blood cells.<sup>278</sup>

A clotting factor dilution effect in whole blood of patients with high Hct could be suggested to explain the increase in CT observed during the ROTEM assays in HL EE+ and would be concordant with the near normalization of CT observed in HL EE+ at corrected Hct.<sup>270</sup> The lack of difference in the amount of generated thrombin and clotting factor levels between HL EE+ and the other groups does not support the hypothesis of a thrombin generation deficiency to explain the CT differences. The lower clot strength of HL EE+ compared to the two other groups in EXTEM and INTEM observed both at native and corrected Hct may suggest an effect of the hemodilution procedure. The correction of Hct using PPP induced a reduction of the platelet count, especially in HL EE+ due to their initial lower platelet count and the greatest amount of PPP required to obtain a 40% Hct in this group. Thus, the lower A20 in EXTEM and INTEM that remained at corrected Hct may have been induced by a decrease in platelet count,<sup>267,268,279</sup> even if we cannot formally exclude the possibility of a qualitative platelet dysfunction in HL EE+.

The hypocoagulable ROTEM profile observed in HL EE+ in whole-blood coagulation assessment may reflect an adaptive process allowing to counterbalance the potential prothrombotic effect induced by increased blood viscosity,<sup>257</sup> even if the possibility of a technical/physical artefact of VHA cannot be entirely excluded.<sup>267,280</sup> The HL included in the present study did not report any history of venous thromboembolism based on the dedicated survey they filled in.<sup>264</sup> This finding could support the concept that an adaptive qualitative whole-blood coagulation process may counterbalance the high viscosity of EE/CMS HL.<sup>150,151</sup> Nevertheless, the small sample size of our study does not allow us to draw epidemiologic

conclusions, and beside physiologic investigations, large clinical and epidemiological studies are required to specifically assess the incidence of venous or arterial thrombotic disorders in HL populations.

In our study, static hemostatic tests (*i.e.*, PT and aPTT) and plasma clotting factor and inhibitor levels seemed mostly not affected either by permanent life in hypoxia, or by EE. Despite numerous studies, inconsistent findings have been reported regarding aPTT and PT changes in LL acutely exposed to HA,<sup>215</sup> while data on HL are rather scarce. The present results are corroborating those of DeSouza et al.<sup>218</sup> who reported no difference in factor VII, VIII and X levels between Andean HL EE+ and HL EE- residing ~1,000 m lower than in the present study. Studies conducted on the Qinghai-Tibet plateau reported conflicting results regarding differences in aPTT and PT values between EE/CMS HL and control HL.<sup>258,259</sup> However, these results should be interpreted with caution, as it remains unclear if these measurements were done with citrate-to-blood ratio adjustment for HL EE+ and because they were performed in different ethnic groups known to have different adaptations to the high-altitude environment.<sup>10,114,130,262</sup>

To have an exhaustive understanding of the hemostasis process in HL, this study lacks a specific assessment of the fibrinolysis phase as well as of the primary hemostasis. Our own data (including APTEM assays results and D-dimers dosages) did not support a hyperfibrinolytic state in HL EE+, which is consistent with previous observations.<sup>218,258</sup> The trend towards higher D-dimers level in the HL EE+ group may be explained by the older age of the HL EE+ participants. Regarding primary hemostasis, it is likely that EE interferes with the normal interaction between platelets and vascular endothelium. Increased Hct (as shown in EE/CMS HL<sup>150,151</sup>) may promote platelets margination and activation, especially at high shear rate, as in arterial vessels.<sup>257</sup> Furthermore, EE/CMS conditions are associated with systemic endothelial dysfunction,<sup>150,199</sup> with a decrease in vascular nitric oxide (NO) bioavailability,<sup>199</sup> that could contribute to platelet activation, as NO is known to modulate platelet reactivity.<sup>257</sup> In agreement with this hypothesis, recent results from the Qinghai-Tibet plateau highlighted higher amount of platelet activation markers in EE/CMS highlanders than in healthy HL controls that we did not investigate in the present study.<sup>190,259</sup> Nevertheless, similar to others,<sup>189</sup> we observed a lower platelet count in HL EE+ as well as an inverse relationship between platelet count and MPV, suggesting that an increased peripheral consumption rather than a reduced platelet production may explain a lower platelet count in HL EE+. This may be in accordance with a recent study

suggesting increased platelet activation and thus apoptosis in HL EE+, where a similar negative correlation between platelet count and MPV was also shown.<sup>190</sup> Finally, an enhanced primary hemostasis process in HL EE+ (although not assessed in the present study) could underlie the lower bleeding and clotting times in HL EE+ versus healthy HL that we reported in a previous preliminary study,<sup>219</sup> despite no hypercoagulable profile as underlined in the present study. Further studies are needed to investigate platelet function and activation in the context of EE.

Our study presents some limitations that should be acknowledged. As emphasized above, we did not assess all the phases of the hemostasis process. Even if VHA allow for a global evaluation of the clotting function, their inability to detect a platelet qualitative dysfunction is a well-known limitation.<sup>220</sup> Furthermore, while measuring the clot formation under low shear rate ( $0.1 \text{ s}^{-1}$ ) as in venous system,<sup>279</sup> the ROTEM assays do not reflect the intra-arterial clot formation mechanisms, mainly involving platelets, sub-endothelium collagen and von Willebrand factor.<sup>220,257</sup> Besides, as previously done,<sup>151</sup> the LL control group included in our study was composed of European healthy participants rather than Peruvian lowlanders. However, to our knowledge, there is no data showing that Peruvian natives from sea level areas exhibit a different coagulation profile than European lowlanders.

In summary, we observed in this cross-sectional study conducted at extreme altitude that EE was not associated with a hypercoagulable state. In contrary, compared to both healthy LL and HL EE-, HL EE+ exhibited a hypocoagulable ROTEM profile, abnormalities that were mostly mitigated after Hct correction. Further studies are necessary to understand the hemostasis process in native Andean HL, potentially impacted by both chronic hypoxia exposure and polycythemia, as well as to determine whether the present findings may represent an adaptive benefit to high-altitude life. Moreover, well-conducted epidemiologic studies are mandatory to specifically assess the incidence of both venous and arterial thrombotic events in HL population, independently of the common associated risk factors.

## TABLE

**Table 1:** Demographic and hematological characteristics, and conventional coagulation tests of the participants.

Variables	LL (n=10)	HL EE- (n=15)	HL EE+ (n=30)	p-value
Male gender	8 (80%)	15 (100%)	30 (100%)	–
Age (years)	33 ± 7	40 ± 13	48 ± 9*	<0.001
Body mass index (kg·m <sup>-2</sup> )	22.4 ± 2.3	26.0 ± 3.3*	27.2 ± 3.5*	0.001
SpO <sub>2</sub> (%)	97 ± 1	83 ± 4*	82 ± 5*	<0.001
CMS status				
No CMS	–	15 (100%)	2 (7%)	
Mild CMS	–	0 (0%)	19 (63%)	–
Mod-to-Sev CMS	–	0 (0%)	9 (30%)	
[Hb] (g·dL <sup>-1</sup> )	14.7 ± 1.2	19.3 ± 1.1*	23.5 ± 1.6* <sup>§</sup>	<0.001
Hct (%)	43 ± 4	56 ± 3*	70 ± 6* <sup>§</sup>	<0.001
Platelet count (× 10 <sup>9</sup> ·L <sup>-1</sup> )	235 ± 28	273 ± 73	216 ± 70 <sup>§</sup>	0.03
MPV (fL)	10.1 ± 0.8	10.1 ± 0.9	10.0 ± 1.1	0.92
Fibrinogen (g·L <sup>-1</sup> )				
Plasma fibrinogen	2.6 ± 0.2	3.0 ± 0.4	3.5 ± 0.8*	0.001
WBFC	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.0 ± 0.3* <sup>§</sup>	<0.001
PT (sec)	13.7 [13.1-13.9]	13.2 [12.5-14.2]	13.4 [13.0-14.4]	0.95
aPTT (sec)	34.0 ± 2.9	36.9 ± 5.3	36.0 ± 4.2	0.27
D-dimers (mg·L <sup>-1</sup> )	0.27 [0.27-0.29]	0.27 [0.27-0.34]	0.31 [0.27-0.42]	0.07

Categorical data are reported in absolute count and percentage (%). Continuous data are reported in mean ± SD or median [25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles].

\*  $p < 0.05$  HL EE+ or HL EE- vs. LL. <sup>§</sup>  $p < 0.05$  HL EE+ vs. HL EE-.

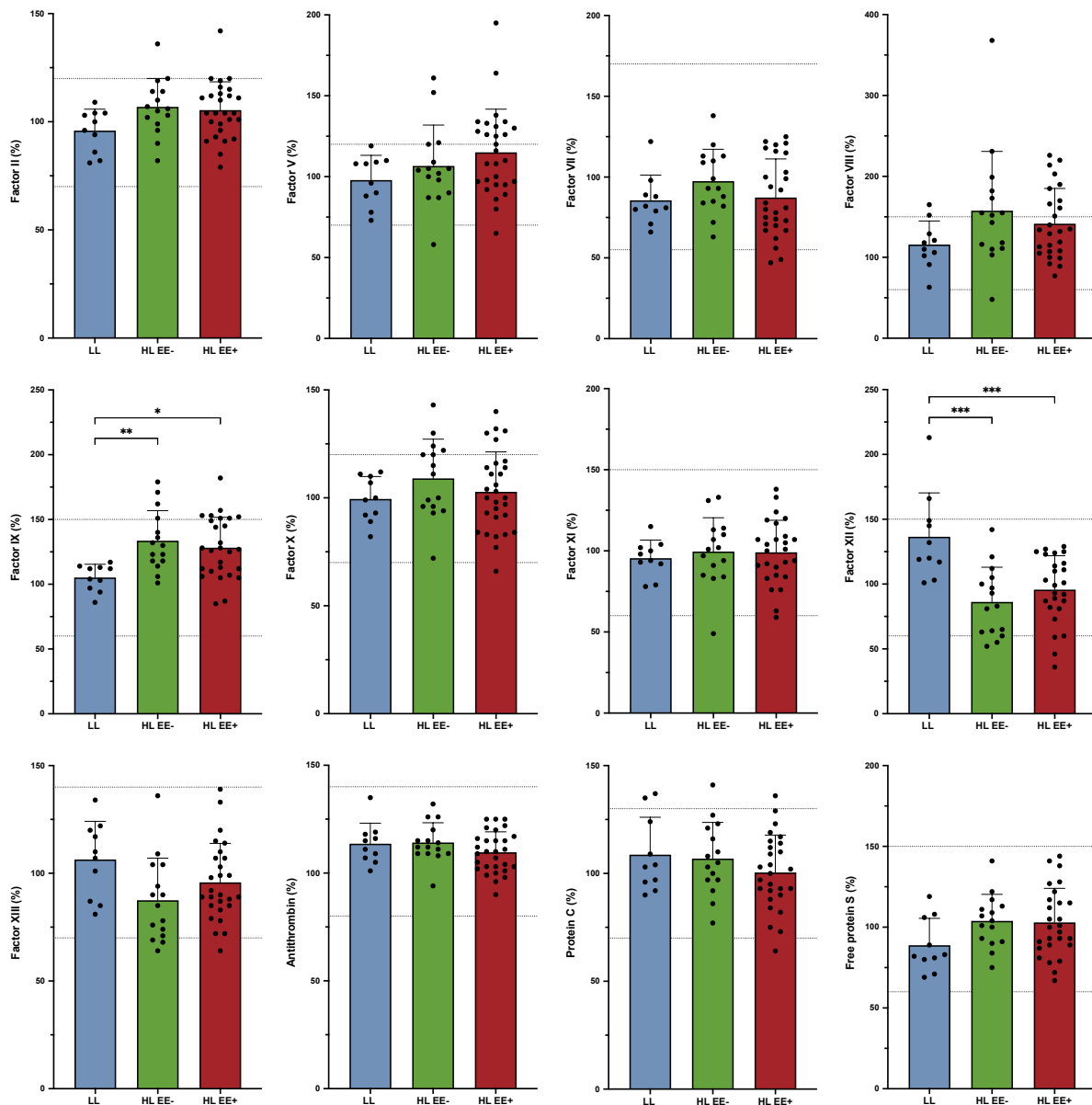
LL, lowlanders; HL EE -, highlanders without excessive erythrocytosis; HL EE +, highlanders with excessive erythrocytosis; SpO<sub>2</sub>, oxygen saturation assessed by finger pulse oximetry; CMS, chronic mountain sickness; [Hb], hemoglobin concentration; Hct, hematocrit; MPV, mean platelet volume; WBFC, whole blood fibrinogen concentration; PT, prothrombin time; aPTT, partial thromboplastin time.

## FIGURES

**Figure 1: Clotting factor and inhibitor plasma levels are almost similar among the lowlander (LL), highlander without (HL EE-) and with excessive erythrocytosis (HL EE+) groups.**

Column bar graph represents mean values with standard deviation in each group with individual values (black dots). Normal ranges (lower and upper limit values) for each parameter are represented by the dotted lines. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

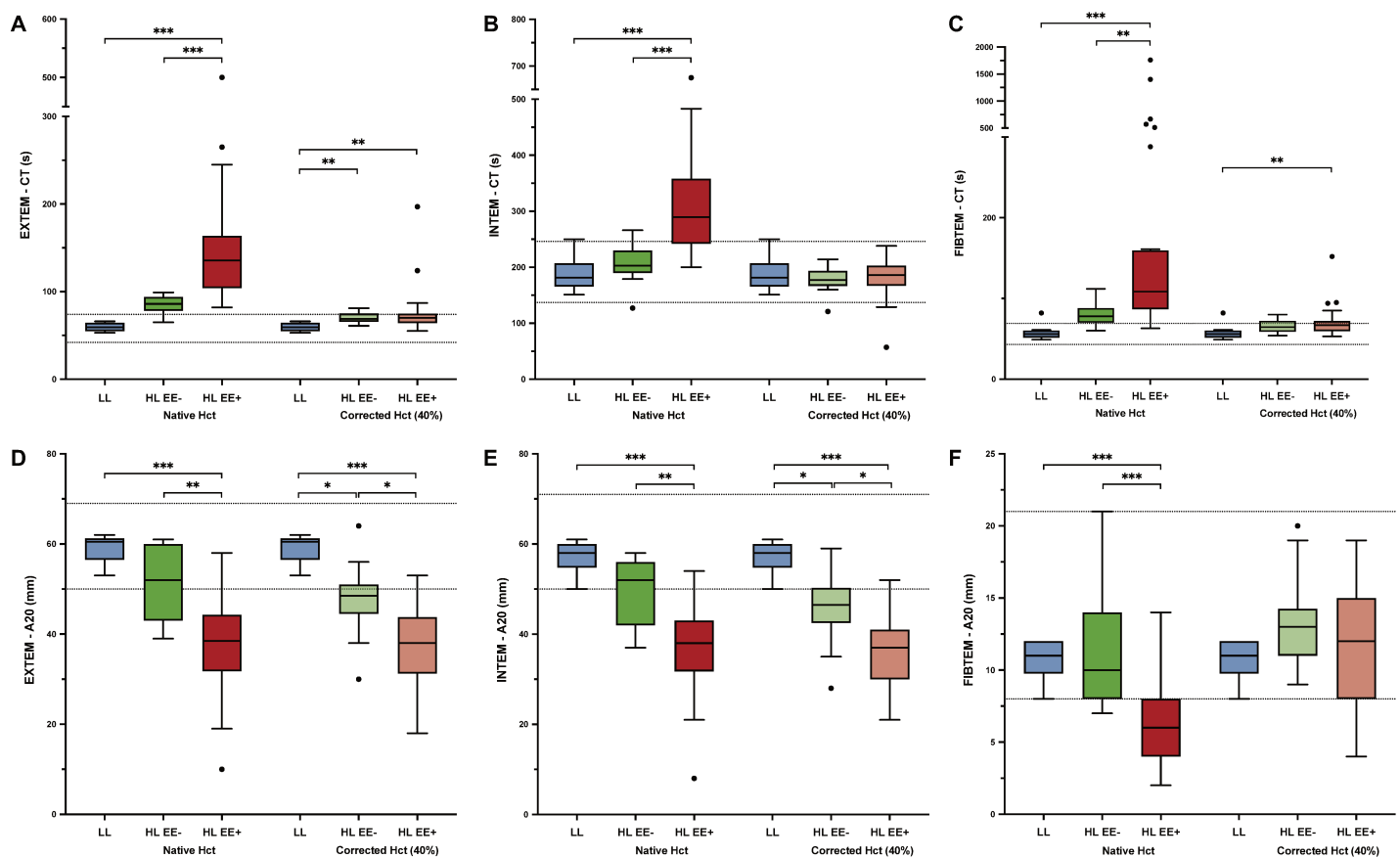
Individual missing data, only in the HL EE+ group: factor II (3), factor V (2), factor VII (3), factor VIII (4), factor IX (3), factor X (1), factor XI (4), factor XII (5), factor XIII (3), antithrombin (1), protein C (3), free protein S (3).



**Figure 2: At native hematocrit (Hct), highlanders (HL) with excessive erythrocytosis (HL EE+) exhibited an hypocoagulable ROTEM profile, compared to HL without excessive erythrocytosis (HL EE-) and lowlanders (LL), which one was only partially corrected when ROTEM assays were secondary performed at corrected Hct (40%) after hemodilution with autologous poor-platelet plasma.**

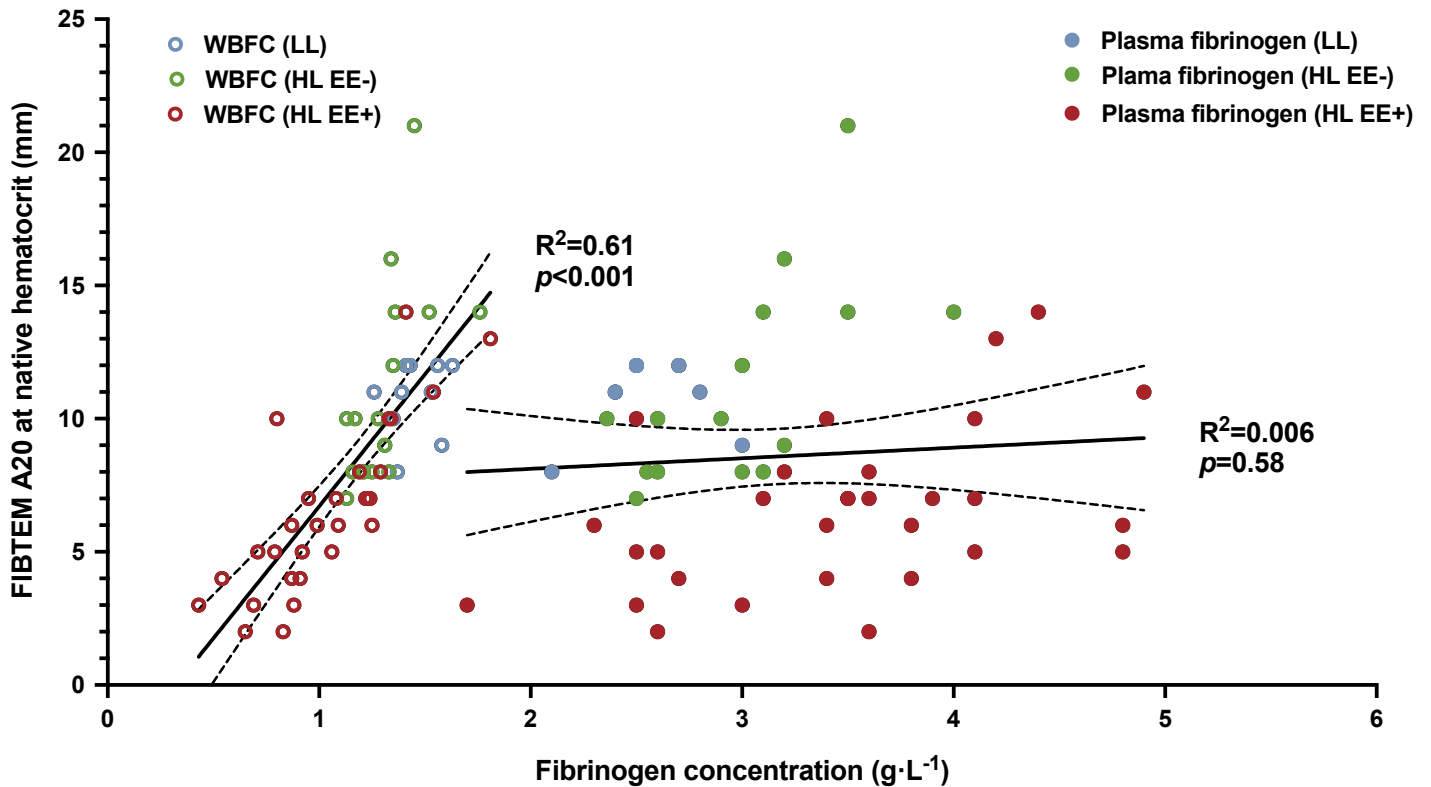
*A-C: Clotting time (CT) in EXTEM (A), INTEM (B) and FIBTEM (C) assays. D-F: Clot amplitude at 20 min (A20) in EXTEM (A), INTEM (B) and FIBTEM (C) assays. Boxplots represent median with 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles (lower and upper hinges). Whiskers extend from the correspondent hinge to the largest or smaller value not further than 1.5 × interquartile range. Horizontal dashed lines represent the reference ranges established at sea level.<sup>266</sup>*

*\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.*



**Figure 3:** At native hematocrit (Hct), in the overall population, only whole-blood fibrinogen concentration (WBFC), and not plasma concentration showed a significant linear relationship with clot strength (A20, amplitude at 20 min) in FIBTEM assay.

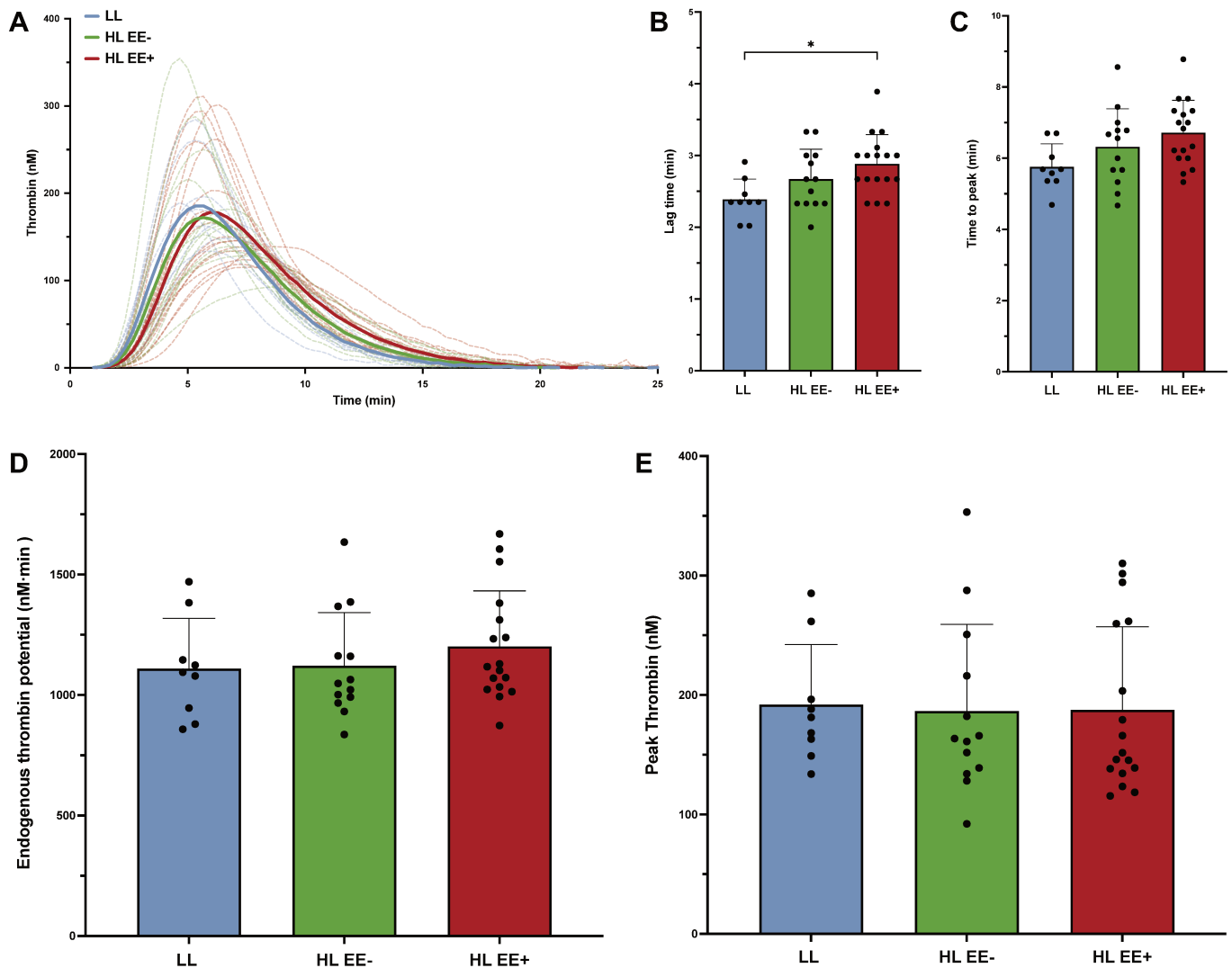
*LL, lowlanders; HL EE-, highlanders without excessive erythrocytosis; HL EE+, highlanders with excessive erythrocytosis.*



**Figure 4: Thrombin generation patterns were almost similar among the groups, with only a significant longer lag time in HL EE+ versus LL.**

LL, lowlanders; HL EE-, highlanders without excessive erythrocytosis; HL EE+, highlanders with excessive erythrocytosis.

A: visual reconstruction of individual thrombin generation curves (dashed lines), with mean curves (bold lines). Column bar graphs represent mean values with standard deviation in each group with individual values (black dots) for lag time (B), time to peak (C), endogenous thrombin potential (D) and peak thrombin (E). \*  $p < 0.05$ .



## ELETRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

### Supplementary method

#### *Adjustment of amount of citrate to the hematocrit value.*

According to guidelines,<sup>265</sup> an adjustment of the 3.2% trisodium citrate volume standardly contained (300  $\mu$ L) in the used 2,7 mL BD Vacutainer® blood tubes (Becton-Dickinson, Le Pont-de-Claix, France, ref. 363083) was considered in highlanders, for hematocrit (Hct) values above 55%, using the following correction equation:  $C = 0.00185 \times (100 - Hct) \times V$ , where C is the volume of trisodium citrate (mL) and V is the amount of blood (mL).

The screening Hct value, measured on a capillary blood sample and obtained (micro-centrifuge method) during the inclusion visit just prior to the venous blood sampling, was used for this adjustment. Subsequently, the foreseeable excess of trisodium citrate volume was removed from the tube using a tuberculin syringe; this method allows to preserve the vacuum in the tube.<sup>281</sup>

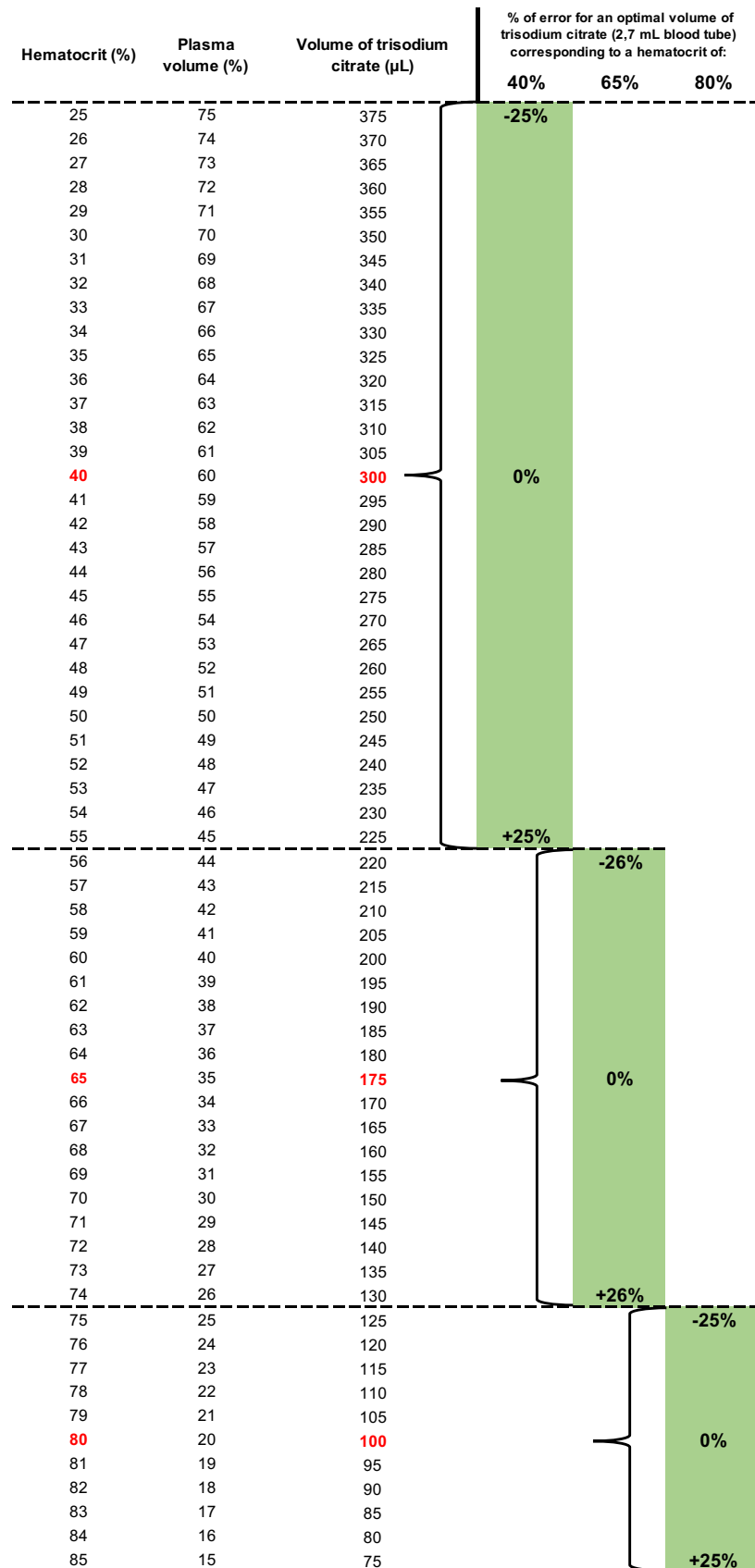
To simplify the process (considering the conduct of the experimentations in a temporary and in-the-field medical research laboratory installed in a hostile environment), pre-defined ranges of Hct (and volumes of trisodium citrate) were used, using the following developed nomogram (Figure S1) :

- According to the correction equation, the amount of trisodium citrate standardly contained in the blood tubes (300  $\mu$ L) is optimal for a 40% Hct. Therefore, it offers a margin of error +/- 25% inside a range of Hct contained between 25% and 55%, corresponding for the upper limit, to the superior limit value for which no citrate adjustment seems necessary.<sup>265,281</sup>
- So, considering a deviation of +/- 25% as acceptable, we built two pre-defined ranges of Hct (for values above 55%), centered on the values of 65% and 80%, around which, inferior and superior limit values corresponding to this acceptable margin of error.
- Thereby, three areas of Hct values were considered:
  - for Hct  $\leq$  55%, no citrate adjustment was done (volume in the tube: 300  $\mu$ L),
  - for Hct between 56% and 74%, a volume of 125  $\mu$ L of trisodium citrate was withdrawn to obtain a final residual amount of 175  $\mu$ L in the tube,
  - for Hct between 75% and 85%, a volume of 200  $\mu$ L of trisodium citrate was withdrawn to obtain a final residual amount of 100  $\mu$ L in the tube.

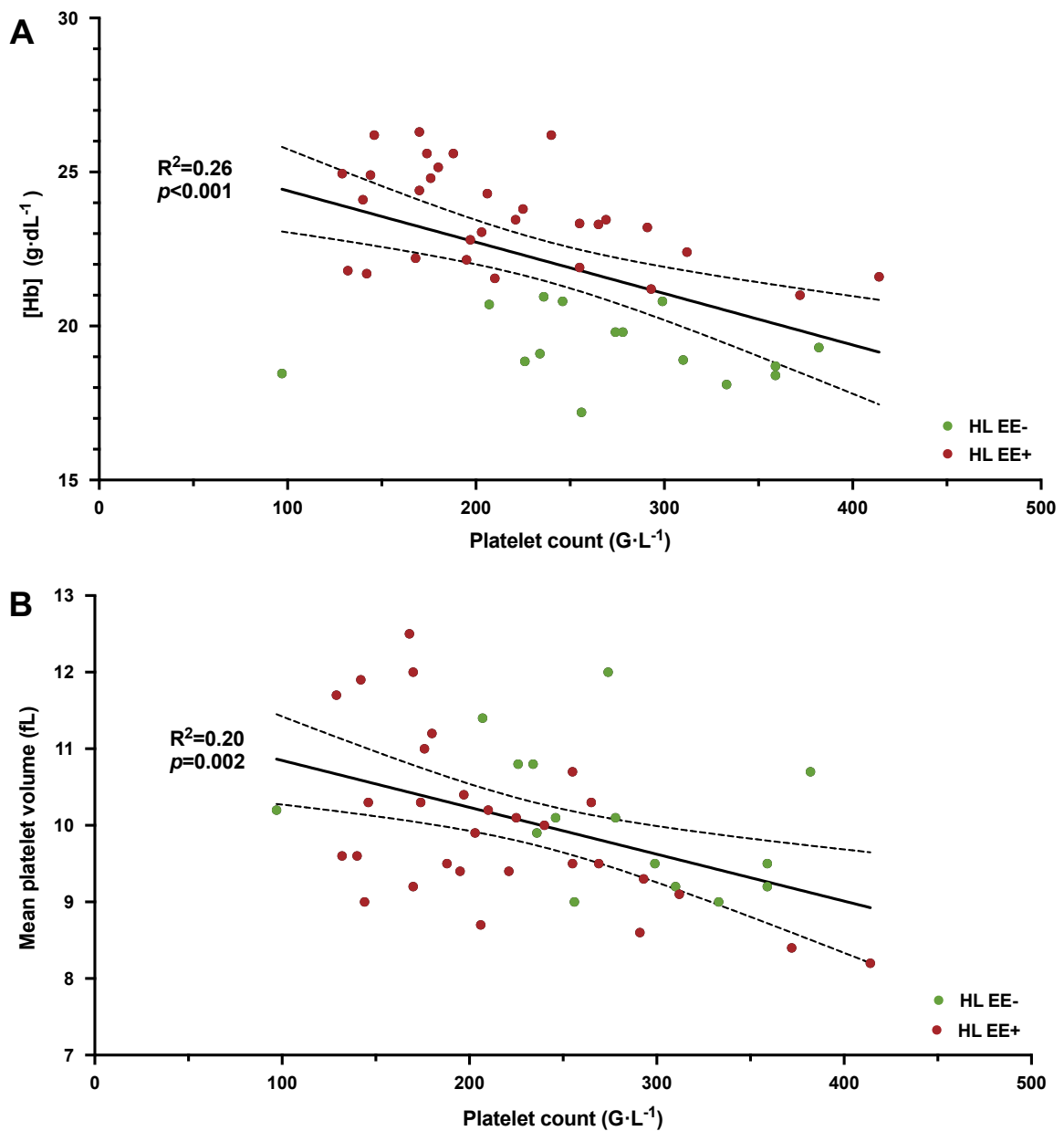
*Thromboelastometry: assays and parameters.*

The four standard ROTEM assays conducted in all participants during the study were the conventional EXTEM, INTEM, FIBTEM and APTEM assays. In the EXTEM test, activation of coagulation with recombinant tissue factor (TF) allows for the exploration of the extrinsic pathway. In the INTEM test, the intrinsic pathway is activated with phospholipid and ellagic acid. With the FIBTEM reagent, activation is similar to EXTEM, but platelets are inhibited with cytochalasin D, in order to study the contribution of fibrinogen to the clot stability. APTEM reagent is similar to EXTEM but contains aprotinin, allowing, by comparison with EXTEM, to detect hyperfibrinolysis.<sup>220</sup> For each ROTEM assay, the following conventional parameters were recorded from the generated TEMogram: CT (clotting time, in seconds, representing the time between activation of the coagulation and the detection of a 2-mm amplitude clot), CFT (clotting formation time, in seconds, representing the time between a 2-mm and a 20-mm amplitude clot), alpha angle (in degree, representing the angle between the middle axis and the tangent to the clotting curve at the 2-mm amplitude point), A10 and A20 (the clot amplitude at 10 and 20 minutes respectively, reported in mm and corresponding to the clot firmness). Clotting time, reflecting clot initiation, is mainly affected by clotting factors, whereas CFT and alpha angle are both reflecting clot formation, mainly influenced by thrombocytes and fibrinogen levels; clot firmness is mainly influenced by thrombocytes, fibrinogen, factor XIII and the fibrinolysis.<sup>220</sup> Therefore, an increased CT and/or CFT, a flattened alpha angle and/or a reduced clot amplitude are in favor of a hypocoagulable state, whereas a shortened CT and/or CFT, an increased alpha angle and/or clot amplitude indicate a hypercoagulable state.<sup>282</sup>

**Figure S1: Developed nomogram for citrate volume adjustment in hemostasis citrated blood tubes according to hematocrit values.**



**Figure S2:** Platelet count in highlander participants, without (HL EE-) and with (HL EE+) excessive erythrocytosis, presented an inverse linear relationship with the hemoglobin concentration ([Hb], panel A), and the mean platelet volume (panel B).



**Table S1:** Comparison of ROTEM parameters between lowlanders (LL) and highlanders with (HL EE+) and without (HL EE-) excessive erythrocytosis permanently living at 5,100 m.

ROTEM tests and parameters	Reference range at SL <sup>a</sup>	LL (n=10)	HL EE- (n=15)	HL EE+ (n=30)	p-value
<b>EXTEM</b>					
CT (s)	42-74	60 [56-64]	86 [80-93]	136 [106-161]* <sup>\$</sup>	<0.001
CFT (s)	46-148	92 [85-98]	131 [98-193]	272 [208-438]* <sup>\$</sup>	<0.001
Alpha angle (°)	63-81	72 [70-73]	64 [56-70]	48 [36-54]* <sup>\$</sup>	<0.001
A10 (mm)	43-65	53 [50-55]	45 [37-51]	30 [24-35]* <sup>\$</sup>	<0.001
A20 (mm)	50-69	61 [57-61]	52 [45-58]	39 [32-44]* <sup>\$</sup>	<0.001
<b>INTEM</b>					
CT (s)	137-246	182 [167-200]	203 [191-226]	290 [243-351]* <sup>\$</sup>	<0.001
CFT (s)	40-100	81 [71-86]	117 [99-191]	292 [218-441]* <sup>\$</sup>	<0.001
Alpha angle (°)	71-82	75 [73-77]	68 [59-71]	49 [35-53]* <sup>\$</sup>	<0.001
A10 (mm)	44-68	52 [50-54]	45 [37-49]	30 [23-35]* <sup>\$</sup>	<0.001
A20 (mm)	50-71	58 [55-60]	52 [43-55]	38 [32-43]* <sup>\$</sup>	<0.001
<b>APTEM <sup>b</sup></b>					
CT (s)	—	61 [55-67] <sup>†</sup>	90 [77-94] <sup>†</sup>	128 [102-171] <sup>†*<sup>\$</sup></sup>	<0.001
CFT (s)	—	91 [87-98] <sup>†</sup>	139 [95-193] <sup>†</sup>	277 [199-436] <sup>†*<sup>\$</sup></sup>	<0.001
Alpha angle (°)	—	72 [70-74] <sup>†</sup>	63 [57-71] <sup>†</sup>	47 [38-55] <sup>†*<sup>\$</sup></sup>	<0.001
A10 (mm)	—	52 [50-53] <sup>†</sup>	43 [37-51] <sup>†</sup>	31 [23-37] <sup>†*<sup>\$</sup></sup>	<0.001
A20 (mm)	—	59 [57-60] <sup>†</sup>	51 [44-58] <sup>†</sup>	39 [32-45] <sup>†*<sup>\$</sup></sup>	<0.001
<b>FIBTEM</b>					
CT (s)	43-69	56 [52-60]	78 [71-87]	109 [88-154]* <sup>\$</sup>	<0.001
A10 (mm)	9-24	11 [10-11]	9 [7-12]	5 [4-7]* <sup>\$</sup>	<0.001
A20 (mm)	8-21	11 [10-12]	10 [8-14]	6 [4-8]* <sup>\$</sup>	<0.001

Data are reported in median [25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles].

\*  $p < 0.05$  HL EE+ or HL EE- vs. LL. <sup>\$</sup>  $p < 0.05$  HL EE+ vs. HL EE-.

<sup>a</sup> Reference range values are obtained from Lang et al.<sup>266</sup>

<sup>b</sup> Interpretation by comparison with EXTEM. Improvement of clot formation and firmness (*i.e.*, decreasing times and increasing amplitudes) in APTEM vs. EXTEM reflects hyperfibrinolysis.

<sup>†</sup>  $p > 0.05$  when compared to the corresponding EXTEM values between the same group of participants (Wilcoxon signed-rank test)  
<sup>SL</sup>, seal level; <sup>LL</sup>, lowlanders; <sup>HL</sup>, highlanders; <sup>EE</sup>, excessive erythrocytosis; <sup>CT</sup>, clotting time; <sup>CFT</sup>, clotting formation time; <sup>A10</sup>, amplitude 10 min after CT; <sup>A20</sup>, amplitude 20 min after CT.

**Table S2:** Comparison of ROTEM parameters between lowlanders (LL) and highlanders (HL EE+) and without (HL EE-) excessive erythrocytosis permanently living at 5,100 m using measurements conducted at corrected hematocrit (40%) for HL EE- and HL EE+ participants.

<b>ROTEM tests and parameters</b>	<b>Reference range at SL <sup>a</sup></b>	<b>LL (n=10)</b>	<b>HL EE- (n=14) Corrected Hct (40%)</b>	<b>HL EE+ (n=28) Corrected Hct (40%)</b>	<b>p-value</b>
<b>EXTEM</b>					
CT (s)	42-74	60 [56-64]	69 [66-75]*	70 [64-74]*	0.001
CFT (s)	46-148	92 [85-98]	169 [134-211]*	301 [210-428]* <sup>§</sup>	<0.001
Alpha angle (°)	63-81	72 [70-73]	62 [59-70]	60 [43-70]*	0.008
A10 (mm)	43-65	53 [50-55]	41 [36-43]	29 [24-35]* <sup>§</sup>	<0.001
A20 (mm)	50-69	61 [57-61]	49 [45-50]*	38 [32-43]* <sup>§</sup>	<0.001
<b>INTEM</b>					
CT (s)	137-246	182 [167-200]	177 [168-191]	186 [168-202]	0.76
CFT (s)	40-100	81 [71-86]	151 [119-202]	261 [205-405]* <sup>§</sup>	<0.001
Alpha angle (°)	71-82	75 [73-77]	68 [63-70]*	63 [55-70]*	<0.001
A10 (mm)	44-68	52 [50-54]	40 [35-43]	30 [24-33]* <sup>§</sup>	<0.001
A20 (mm)	50-71	58 [55-60]	47 [43-50]*	37 [31-41]* <sup>§</sup>	<0.001
<b>FIBTEM</b>					
CT (s)	43-69	56 [52-60]	65 [59-71]	67 [61-72]*	0.01
A10 (mm)	9-24	11 [10-11]	12 [10-13]	11 [8-14]	0.31
A20 (mm)	8-21	11 [10-12]	13 [11-14]	12 [8-15]	0.13

Data are reported in median [25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles].

\*  $p < 0.05$  HL EE+ or HL EE- vs. LL. <sup>§</sup>  $p < 0.05$  HL EE+ vs. HL EE-.

<sup>a</sup> Reference range values are obtained from Lang et al.<sup>266</sup>

SL, sea level; LL, lowlanders; HL, highlanders; EE, excessive erythrocytosis; CT, clotting time; CFT, clotting formation time; A10, amplitude 10 min after CT; A20, amplitude 20 min after CT.

## **6 Étude 4 : Effet précoce de l'acétazolamide sur la masse d'hémoglobine et le volume plasmatique chez des patients souffrant de mal chronique des montagnes – Analyse intermédiaire d'une étude randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo**

### **6.1 Introduction**

Plus de 80 millions de personnes dans le monde résident de manière permanente dans des zones situées en haute altitude (c'est à dire, au-dessus de 2500 m) et sont exposés à une hypoxie hypobare chronique.<sup>21</sup> Les mécanismes d'adaptation à ce stress hypoxique incluent une augmentation de la [Hb], particulièrement marquée dans les populations andéennes.<sup>137,146</sup> Cependant, chez ces habitants de haute altitude, une EE (définie comme une [Hb]  $\geq 21$  g·dL<sup>-1</sup> chez l'homme et  $\geq 19$  g·dL<sup>-1</sup> chez la femme), peut se développer et est susceptible d'entraîner des signes et symptômes cliniques, caractérisant alors le syndrome du CMS.<sup>126</sup> La prévalence du CMS est importante dans les Andes,<sup>126,137,146</sup> et celui-ci a été montré associé à une dysfonction vasculaire systémique,<sup>198,199,283</sup> et/ou à une hypertension pulmonaire.<sup>124,197</sup> Le CMS est donc susceptible de réduire l'espérance de vie.<sup>137,146</sup>

Alors que diverses interventions pharmacologiques ou non-pharmacologiques ont été testées pour le traitement de l'EE et du CMS, le traitement optimal pour ces conditions reste à identifier.<sup>226,230</sup> Parmi les molécules précédemment testées, une dose journalière d'ACZ de 250 mg a été montrée comme la dose minimale efficace pour augmenter la RVH et pour diminuer l'hypoxémie et l'Hct jusqu'à 6 mois, chez des habitants de haute altitude souffrant de CMS à Cerro de Pasco (4300 m, Pérou).<sup>234-237</sup> Cependant les mécanismes exacts par lesquels l'ACZ entraîne une diminution de l'Hct restent insuffisamment explorés. Dans les études cliniques précédemment publiées, il a été suggéré que cette diminution de l'Hct était la conséquence d'une diminution de l'érythropoïèse induite par l'hypoxie, et donc d'une diminution de l'Hb<sub>mass</sub> ou du RBCV,<sup>234,235</sup> alors qu'une étude animale suggérait, à l'inverse, une expansion du PV.<sup>238</sup>

Par ailleurs, la capacité de cette faible dose journalière d'ACZ pour suffisamment augmenter la ventilation, améliorer l'hypoxémie et réduire l'Hct, chez les patients souffrant de CMS et vivant à une altitude supérieure à 4300 m (c'est à dire à des altitudes où la pression partielle en oxygène est encore plus faible), reste incertaine. Les modifications d'Hb<sub>mass</sub> et de volumes intravasculaires qui peuvent sous-tendre cette modification d'Hct restent également à élucider. Par ailleurs, les statines sont des molécules qui pourraient être bénéfiques dans le traitement du CMS, en raison de leurs effets pléiotropes sur la fonction vasculaire,<sup>239</sup> et possiblement également sur l'érythropoïèse,<sup>240</sup> mais leurs effets n'ont jamais été correctement testés dans cette indication.

Ainsi, nous avons mené à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou),<sup>20</sup> une étude en double aveugle, contrôlée contre placebo, pour évaluer l'efficacité de l'ACZ et de l'atorvastatine, dans le but de diminuer l'Hct, d'améliorer les symptômes et de comprendre les changements sous-jacents en termes de volumes intravasculaires, chez des patients souffrant de CMS. Alors que les évaluations finales de cet essai clinique (initialement prévues après 9 mois de traitement) ont été perturbées par la pandémie de COVID-19,<sup>284</sup> la plupart des patients inclus dans l'étude initiale ont été réévalués après 3 semaines de traitement permettant d'évaluer 1) l'efficacité potentielle à court terme des traitements sur l'Hct et 2) les mécanismes sous-jacents potentiels de ces traitements sur les volumes intravasculaires. Nous avons émis l'hypothèse que seule l'ACZ réduirait l'Hct après 3 semaines de traitement et que ce changement précoce serait médié à la fois par une diminution de l'Hb<sub>mass</sub> et une expansion du PV.

## 6.2 Résumé

**Introduction :** Le mal chronique des montagnes (*chronic mountain sickness*, CMS), associant érythrocytose excessive (EE) avec des signes et symptômes cliniques, chez les habitants de haute altitude, constitue un problème de santé publique dans les zones de haute altitude, particulièrement dans les Andes, avec des possibilités thérapeutiques limitées. Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer, chez des habitants de haute altitude souffrant de CMS et résidant en permanence à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou), l'efficacité précoce d'un traitement par acétazolamide (ACZ) ou par atorvastatine, pour réduire l'hématocrite (Hct) et d'étudier les mécanismes sous-jacents à une éventuelle diminution de l'Hct, en termes de volumes intravasculaires.

**Méthodes :** Quarante et un hommes (âge moyen  $\pm$  écart-type :  $46 \pm 8$  ans), habitants permanents de La Rinconada depuis 15 [10-20] années en médiane [25<sup>ème</sup>-75<sup>ème</sup> percentiles], diagnostiqués avec un CMS, ont été randomisés dans une étude en groupes parallèles conduite en double aveugle, entre un traitement par ACZ (250 mg, 1 fois par jour, n=13 patients), atorvastatine (20 mg, 1 fois par jour, n=14 patients) ou placebo (n=14 patients). L'hématocrite (critère de jugement principal), ainsi que les gaz du sang artériel, la masse totale d'hémoglobine ( $Hb_{mass}$ ) et les volumes intravasculaires dérivés de celle-ci, ont été mesurés, juste avant l'initiation du traitement, et après une durée moyenne ( $\pm$  écart-type) de traitement de  $19 \pm 2$  jours.

**Résultats :** L'ACZ augmentait la  $PaO_2$  de +13,4% (IC95% : 4,3 à 22,5%) et diminuait l'Hct de -5,2% (IC95% : -8,3 à -2,2%), tandis que l'Hct restait inchangé dans les groupes placebo et atorvastatine. L'ACZ tendait à diminuer l' $Hb_{mass}$  (-2,6%, IC95% : -5,7 à 0,5%), diminuait le volume total des globules rouges (RBCV, -5,3%, IC95% : -10,3 à -0,3%) et augmentait le volume plasmatique (PV, +17,6%, IC95% : 4,9% à 30,3%). L'atorvastatine n'avait aucun effet sur les volumes intravasculaires, tandis que l' $Hb_{mass}$  et le RBCV augmentaient dans le groupe placebo (+6,1%, IC95% : 4,2 à 7,9% et +7,0%, IC95% : 2,7 à 11,4%, respectivement).

**Conclusions :** Un traitement court par ACZ était efficace pour réduire l'Hct chez des patients présentant un CMS et vivant à une altitude supérieure à 5000 m. Cette diminution de l'Hct était associée à la fois à une augmentation du PV et à une réduction du RBCV.

### 6.3 Article publié et contribution personnelle

Le manuscrit présentant les résultats de cet essai randomisé et contrôlé a été accepté pour publication en mai 2023 dans la revue *Pulmonology* (impact factor 2021 : 9.216 ; catégorie SIGAPS B).<sup>285</sup> Cette publication (*article in press*) est reproduite ci-dessous.

Ma contribution personnelle à ce travail a été la suivante :

- Participation à la conception de l'étude.
- Participation à la conduite de l'étude.
- Réalisation de l'analyse statistique, analyse et interprétation des données.
- Écriture de la première version du manuscrit.
- Réponse aux commentaires des relecteurs et amendement du manuscrit initialement soumis (1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> révisions).



## ORIGINAL ARTICLE

## Early effects of acetazolamide on hemoglobin mass and plasma volume in chronic mountain sickness at 5100 m

B. Champigneulle<sup>a,\*</sup>, E. Stauffer<sup>b,c,d</sup>, P. Robach<sup>a,e</sup>, S. Doutreleau<sup>a</sup>, C.A. Howe<sup>f</sup>, A. Pina<sup>g</sup>, A.A. Salazar-Granara<sup>h</sup>, I. Hanco<sup>a</sup>, D. Guergour<sup>i</sup>, J.V. Brugniaux<sup>a</sup>, P. Connes<sup>b,c</sup>, A. Pichon<sup>j</sup>, S. Verges<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Univ. Grenoble Alpes, Inserm, CHU Grenoble Alpes, HP2, 38000 Grenoble, France

<sup>b</sup> Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (LIBM) EA7424, Team "Vascular Biology and Red Blood Cell", Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, France

<sup>c</sup> Laboratoire d'Excellence du Globule Rouge (Labex GR-Ex), PRES Sorbonne, Paris, France

<sup>d</sup> Exploration Fonctionnelle Respiratoire, Médecine du Sport et de l'Activité Physique, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Croix Rousse, Lyon, France

<sup>e</sup> National School for Mountain Sports, Site of the National School for Skiing and Mountaineering (ENSA), Chamonix, France

<sup>f</sup> Centre for Heart, Lung and Vascular Health, School of Health and Exercise Sciences, University of British Columbia - Okanagan, Kelowna, Canada

<sup>g</sup> Department of Cardiovascular, Neural and Metabolic Sciences, Istituto Auxologico Italiano, IRCCS, S. Luca Hospital, Milan, Italy

<sup>h</sup> Universidad de San Martín de Porres, School of Medicine, Research Centre in Altitude Medicine, Lima, Peru

<sup>i</sup> Unité Biochimie Immunoanalyse, Service de Biochimie Biologie Moléculaire et Toxicologie Environnementale, Institut de Biologie et Pathologie, CHU Grenoble Alpes, France

<sup>j</sup> Laboratoire Move EA 6314, Faculté des Sciences du Sport, Universit. De Poitiers, Poitiers, France

Received 20 November 2022; accepted 10 May 2023

Available online xxx

### KEYWORDS

Chronic mountain sickness;  
Acetazolamide;  
Excessive erythrocytosis;

### Abstract

*Introduction and objectives:* Chronic Mountain Sickness (CMS) syndrome, combining excessive erythrocytosis and clinical symptoms in highlanders, remains a public health concern in high-altitude areas, especially in the Andes, with limited therapeutic approaches. The objectives of this study were to assess in CMS-highlanders permanently living in La Rinconada (5100–5300 m, Peru, the highest city in the world), the early efficacy of acetazolamide (ACZ) and atorvastatin

*Abbreviations:* ABP, arterial blood pressure; ACZ, acetazolamide; BL, baseline; BV, blood volume; CMS, chronic mountain sickness; CO, carbon monoxide; EE, excessive erythrocytosis; EPO, erythropoietin; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in the first second; FVC, forced vital capacity; Hct, hematocrit; [Hb], hemoglobin concentration; Hb<sub>mass</sub>, total hemoglobin mass; PaO<sub>2</sub>, arterial partial pressure of oxygen; PaCO<sub>2</sub>, arterial partial pressure of carbon dioxide; PV, plasma volume; RBCV, red blood cell volume; RAAS, renin-angiotensin-aldosterone system; SpO<sub>2</sub>, transcutaneous oxygen saturation; sTfR, soluble transferrin receptor; %HbCO, venous carboxyhemoglobin.

\* Corresponding author at: Laboratoire HP2 (U1300 INSERM), Univ. Grenoble Alpes, UM Sports Pathologies, Hôpital Sud, CS 10217, 38043 Grenoble Cedex 9 - France.

E-mail address: BChampigneulle@chu-grenoble.fr (B. Champigneulle).

<https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2023.05.006>

2531-0437/© 2023 Sociedade Portuguesa de Pneumologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article in press as: B. Champigneulle, E. Stauffer, P. Robach et al., Early effects of acetazolamide on hemoglobin mass and plasma volume in chronic mountain sickness at 5100 m, Pulmonology (2023), <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2023.05.006>

Plasma volume;  
Total hemoglobin  
mass

to reduce hematocrit (Hct), as well as the underlying mechanisms focusing on intravascular volumes.

**Materials and methods:** Forty-one males ( $46 \pm 8$  years of age) permanently living in La Rinconada for 15 [10–20] years and suffering from CMS were randomized between ACZ (250 mg once-daily;  $N = 13$ ), atorvastatin (20 mg once-daily;  $N = 14$ ) or placebo ( $N = 14$ ) uptake in a double-blinded parallel study. Hematocrit (primary endpoint) as well as arterial blood gasses, total hemoglobin mass ( $Hb_{\text{mass}}$ ) and intravascular volumes were assessed at baseline and after a mean ( $\pm$ SD) treatment duration of  $19 \pm 2$  days.

**Results:** ACZ increased  $PaO_2$  by +13.4% (95% CI: 4.3 to 22.5%) and decreased Hct by -5.2% (95% CI: -8.3 to -2.2%), whereas Hct remained unchanged with placebo or atorvastatin. ACZ tended to decrease  $Hb_{\text{mass}}$  (-2.6%, 95% CI: -5.7 to 0.5%), decreased total red blood cell volume (RBCV, -5.3%, 95% CI: -10.3 to -0.3%) and increased plasma volume (PV, +17.6%, 95% CI: 4.9 to 30.3%). Atorvastatin had no effect on intravascular volumes, while  $Hb_{\text{mass}}$  and RBCV increased in the placebo group (+6.1%, 95% CI: 4.2 to 7.9% and +7.0%, 95% CI: 2.7 to 11.4%, respectively).

**Conclusions:** Short-term ACZ uptake was effective to reduce Hct in CMS-highlanders living at extreme altitude  $> 5,000$  m and was associated with both an increase in PV and a reduction in RBCV.

© 2023 Sociedade Portuguesa de Pneumologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introduction

More than 80 million people worldwide live permanently in high-altitude areas (*i.e.*,  $> 2500$  m) and are exposed to chronic hypobaric hypoxia.<sup>1</sup> Mechanisms of adaptation to this hypoxic stress include increasing levels of hemoglobin concentration [Hb], especially in native Andean populations.<sup>2,3</sup> However, among highlanders, excessive erythrocytosis (EE, defined as  $[Hb] \geq 21$  g·dL<sup>-1</sup> in men and  $\geq 19$  g·dL<sup>-1</sup> in women<sup>4</sup>) can occur and lead to severe clinical symptoms characterizing the chronic mountain sickness (CMS) syndrome. CMS is highly prevalent in Andean area,<sup>2–4</sup> and is associated with systemic vascular dysfunction<sup>5–7</sup> and/or pulmonary hypertension<sup>8,9</sup> and may reduce life expectancy.<sup>2,3</sup>

While several pharmacological or non-pharmacological interventions have been tested for EE and CMS, the optimal treatment for these conditions remains to be identified.<sup>10,11</sup> Among previously tested molecules, a 250 mg once-daily dose of acetazolamide (ACZ) has been shown to be the minimal effective dose to increase ventilatory response to hypoxia and to reduce both hypoxemia and hematocrit (Hct) up to 6 months in CMS highlanders at  $\sim 4300$  m.<sup>12–15</sup> However, the exact mechanisms by which ACZ decreased Hct remain unclear, some results in highlanders suggesting a decrease in the hypoxia-induced erythropoiesis and possibly in total hemoglobin mass ( $Hb_{\text{mass}}$ ),<sup>13,14</sup> while an animal study suggested an expansion of plasma volume (PV), albeit non-significant compared to hypoxic controls.<sup>16</sup> The ability of this daily low-dosage of ACZ to sufficiently increase ventilation, improve hypoxemia, and to reduce Hct in CMS patients living at higher altitudes (where partial oxygen pressure is lower) remains uncertain. The changes in  $Hb_{\text{mass}}$  and blood volumes that may underlie this change in Hct also remain to elucidate. Statins are other molecules that could be beneficial against CMS through their pleiotropic effects on vascular function<sup>17</sup> and possibly on erythropoiesis<sup>18</sup> but their effects have never been properly tested in this context. Thus, we conducted in La Rinconada (a gold mining city located in

southern Peru at 5100–5300 m and considered as the highest city in the world<sup>19</sup>), a double-blinded, placebo-controlled study, to assess the efficacy of ACZ and statins to decrease Hct, improve CMS condition and to understand the underlying changes in intravascular volumes.

While the final evaluations of this clinical trial (initially planned after 9 months of treatment) were disturbed by the COVID-19 pandemic,<sup>20</sup> most of the patients included were reevaluated after 3 weeks of treatment in order to assess 1) the potential short-term efficacy of the treatments on Hct and 2) the potential underlying mechanisms of these treatments on intravascular volumes. We hypothesized that ACZ only would reduce the Hct following 3 weeks of treatment, and that this early change would be mediated by both a decrease in  $Hb_{\text{mass}}$  and a PV expansion.

## Material and methods

### Study design

Within a large research project (Expedition5300) conducted in La Rinconada,<sup>19</sup> CMS highlanders permanently living in the city were included in a randomized, double-blinded, parallel, placebo-controlled study after having given their written informed consent. This study was approved by the ethic committee of the Universidad San Martín de Porres, Lima, Peru (IRB00003251) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

### Participants and screening

CMS participants were recruited among the inhabitants of La Rinconada who spontaneously reported to our temporary medical research laboratory. Screening for inclusion was performed during a medical consultation conducted by a local native-Spanish speaking investigator. Male highlanders, 18 – 55 years old, native from the Altiplano area (*i.e.*, born above 3500 m), permanently living for more than 3 years in

La Rinconada, whose CMS was formally diagnosed during an initial medical visit, were invited to participate. Exclusion criteria included a history or a newly-diagnosed condition that could worsen hypoxemia and thus interfere with the CMS diagnosis<sup>4</sup> as well as relative or absolute contra-indication to drug administration (*i.e.* obesity - defined as a body mass index  $\geq 30 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ , active smoking or drug intake, any cardio-respiratory, neurological, and metabolic or kidney disease). No patients had previously been treated for CMS, neither by ACZ nor phlebotomy before inclusion. The initial diagnosis of CMS was made according to the 2005 consensus<sup>4</sup> based on a Qinghai (or total) CMS score  $\geq 6$ , including the presence of EE.<sup>3,4</sup> The total CMS score is based on the evaluation of seven clinical signs or symptoms (breathlessness and/or palpitations, sleep disturbance, cyanosis, venous dilatation, paresthesia, headache, tinnitus) from 0 (absence of symptom) to 3 (severe symptom), to which another 3 points are added in the presence of EE ([Hb]  $\geq 21 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$  for men). Severity of CMS is defined as mild (total CMS score = 6–10), moderate (total CMS score = 11–14) or severe (total CMS score  $\geq 15$ ).<sup>4</sup> The subscore corresponding only to the aforementioned clinical part (*i.e.*, symptoms severity) is reported as the CMS clinical score.

During the inclusion visit, capillary [Hb] was measured using a HemoCue system (Hb201+, HemoCue AB, Ängelholm, Sweden) and transcutaneous oxygen saturation (SpO<sub>2</sub>) was measured by a finger sensor (Nellcor OxiMax N-65, Medtronic, Dublin, Ireland) after a 5-minute rest period in a sitting position. To avoid inclusion of highlanders with undiagnosed respiratory disease, pulmonary function was assessed during the inclusion visit using a portable spirometer (EasyOne, NDD Medizintechnik AG, Zurich, Switzerland). Forced vital capacity (FVC) and forced expiratory volume in one second (FEV<sub>1</sub>) were reported as percentages of Andean high-altitude population predicted values.<sup>21</sup>

## Intervention

After completion of the baseline (BL) measurements (see below), participants were randomly assigned to a treatment arm (placebo, acetazolamide 250 mg q.d. or atorvastatin 20 mg q.d.), using a 1:1:1 parallel design, initially for a total treatment duration of 9 months. To avoid potential dose-dependent side-effects that could jeopardize the compliance of the participants, the drug dosages were chosen as the minimal potentially effective dosage.<sup>13,18</sup> Both investigators and participants were blinded to the randomization list. Identical capsules of active drugs or placebo were prepared by the pharmacy unit in France and packed in identical box, only identified by the participant ID. Participants were asked to take their capsules every morning, without any supervision. Delivery of the capsule boxes to the participants was organized on a regular basis by a local researcher to check compliance and any side effect.

## Outcomes and measurements

According to the initially planned study which aimed to assess the long-term (9 months) effects of the treatments, the primary outcome of this study was the change in Hct from BL measurement to 3-week (W3) reassessment. Secondary outcomes at + 3 weeks included the changes in CMS

scores, arterial blood gasses, changes in Hb<sub>mass</sub> and intravascular volumes, changes in erythropoiesis biomarkers, as well as potential adverse effects induced by treatments.

**Hematocrit and [Hb] measurements.** From a venous heparinized blood sample, Hct was measured using microcentrifuge method (HemataSTAT II, Separation Technology Inc., Sandford, USA) and [Hb] was measured using a co-oximeter (ABL 80 OSM, Radiometer, Copenhagen, Denmark). Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) was calculated as [Hb]/Hct ratio.

**Arterial blood gasses.** An arterial blood sample was obtained from a radial artery puncture, using a pre-heparinized syringe, and was immediately analyzed with a portable blood gas analyzer (i-STAT, Abbott Point of Care, Princeton, New Jersey, USA) to measure arterial pH, arterial partial pressure of oxygen (PaO<sub>2</sub>, mmHg) and arterial partial pressure of carbon dioxide (PaCO<sub>2</sub>, mmHg). In addition, serum creatinine and potassium levels were measured to monitor potential diuretic-associated side effects of ACZ.

**Total hemoglobin mass and intravascular volumes.** Using the carbon monoxide (CO) rebreathing method, Hb<sub>mass</sub> and derived intravascular volumes [total red blood cell volume (RBCV), PV and total blood volume (BV)] were determined using an automated system (OpCO, Detalo Health, Copenhagen, Denmark).<sup>22,23</sup>

**Erythropoiesis assessment.** Serum concentration of erythropoietin (EPO) and soluble transferrin receptor (sTfR), a biomarker of the erythropoietic activity,<sup>24</sup> were later measured from serum samples obtained from venous blood after centrifugation and stored at  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  until further analyses.

More details about the procedures can be found in the online supplementary material.

## Statistical analysis

**Initial sample size calculation.** We estimated that 15 participants per arm would be necessary to detect a within group difference in Hct of 5%, with a power of 80% and a type I error of 5%. This computation was based on Hct values of  $74 \pm 6\%$  previously observed in CMS inhabitants of La Rinconada<sup>22,25</sup> and the 5%-effect of ACZ on Hct previously demonstrated, albeit at lower altitude, for treatment durations ranging from 3 to 24 weeks.<sup>13–15</sup> To account for a potential high rate of dropouts at follow-up, we planned to include a total of 60 CMS participants (*i.e.*, 20 participants per arm).

**Statistical analysis.** After confirming the normality of the main data (using Shapiro-Wilk test and quantile-quantile plots), continuous data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or expressed in median [25th-75th percentiles], as appropriate. Categorical data, expressed in absolute count and percentage (%), were compared using Yate's corrected Chi-Squared test or Fisher's exact test. Baseline characteristics between the treatments' groups were compared using a one-way analyze of variance (ANOVA) or a Kruskal-Wallis test for non-parametric data. Changes over the time of treatment in the three groups were first analyzed using  $2 \times 2$  mixed ANOVA, followed by post-hoc paired t-tests with Bonferroni correction to highlight within-group changes over the time. The non-normally distributed EPO data were log-transformed to meet normality assumption. Within-group percentage changes were provided with their 95%

confidence interval (CI). Strength of association between within groups percent changes of relevant variables were performed using Spearman correlation coefficients.

All tests were two-sided and a  $p$ -value  $<0.05$  (or a 95%CI excluding zero) was considered significant. All statistical analyses were performed using R software (version 4.1.2) and GraphPad Prism (version 9.3.1).

## Results

### Study population

Among the 60 CMS highlanders initially randomized, 41 (68%) were reevaluated after  $19 \pm 2$  days of treatment in La Rinconada (eFig. 1) and did not differ at baseline from those included but not re-evaluated (eTable 1). Causes of no reassessment included: late inclusion not commensurate with the global expedition schedule (*i.e.* less than 3 weeks of treatment before the departure of the research team) ( $n = 9$ ), early loss at follow-up ( $n = 6$ ) and logistic constraint ( $n = 4$ ). Baseline characteristics of the 41 patients are provided in Table 1. Most of the patients ( $n = 37$ , *i.e.* 90%) were classified as mild CMS. None of them had chronic medication or declared any other drug intake beyond those provided by the experimenters during the study period.

### Early effects of treatments on hematocrit and blood oxygenation

After 3 weeks of drug administration, ACZ significantly reduced Hct and [Hb] by  $-5.2\%$  (95% CI:  $-8.3$  to  $-2.2\%$ ) and  $-2.7\%$  (95% CI:  $-4.4$  to  $-1.1\%$ ), respectively, whereas no changes were observed in either the placebo or atorvastatin groups (Table 2). No change in MCHC was observed in any group. CMS severity scores significantly decreased or tended to decrease over the treatment period in all groups (Table 2). ACZ-induced metabolic acidosis (attesting the good

observance of patients in the ACZ group) was partially compensated by an increase in ventilation as shown by the significant drop in PaCO<sub>2</sub> (Fig. 1A and 1C). This hyperventilation was sufficient to increase PaO<sub>2</sub> in the ACZ group ( $+13.4\%$ , 95% CI: 4.3 to 22.5%) whereas no changes in blood oxygenation were observed in the other two groups (Fig. 1B).

### Changes in Hb<sub>mass</sub> and derived intravascular volumes

In the ACZ group, Hb<sub>mass</sub> tended to decrease, albeit non-significantly ( $-2.6\%$ , 95% CI:  $-5.7$  to  $0.5\%$ ; Fig. 2A), whereas RBCV significantly decreased ( $-5.3\%$ , 95% CI:  $-10.3$  to  $-0.3\%$ ; Fig. 2B) and PV significantly increased ( $+17.6\%$ , 95% CI: 4.9 to 30.3%; Fig. 2C), without any change in BV. EPO level tended to decrease ( $p = 0.06$ ) in the ACZ group while no significant EPO changes were observed in the two other groups (Table 2).

No changes in Hb<sub>mass</sub> and in derived intravascular volumes were observed in the atorvastatin group (Fig. 2). An increase in Hb<sub>mass</sub> was observed in the placebo group ( $+6.1\%$ , 95% CI: 4.2 to 7.9%; Fig. 2A), as well as in RBCV ( $+7.0\%$ , 95% CI: 2.7 to 11.4%; Fig. 2B), leading to an elevated BV ( $+6.7\%$ , 95% CI: 5.0 to 8.4%; Fig. 2D), and a concomitant trend ( $p = 0.06$ ) towards higher levels of sTfR (Table 1), suggesting a slightly boosted erythropoietic activity.

### Correlations in the ACZ group

The decrease in Hct in the ACZ group was correlated with the increase in PV ( $\rho = -0.78$ ,  $p = 0.004$ ) and with the decrease in RBCV ( $\rho = 0.67$ ,  $p = 0.02$ ); furthermore, the decrease in Hct tended to correlate with the change in EPO ( $\rho = 0.60$ ,  $p = 0.06$ , eFig. 2).

The increase in PaO<sub>2</sub> in the ACZ group was correlated with the increase in PV ( $\rho = 0.77$ ,  $p = 0.01$ ) whereas no significant correlation was highlighted between the increase in PaO<sub>2</sub> and the change in Hb<sub>mass</sub> nor in RBCV (eFig. 2).

**Table 1** Baseline characteristics of the 41 chronic mountain sickness highlanders assessed before and after 3 weeks of treatment.

Variables	Acetazolamide (N = 13)	Atorvastatin (N = 14)	Placebo (N = 14)	p-value
Age (years)	45 ± 8	46 ± 8	46 ± 8	0.84
Body mass index (kg·m <sup>-2</sup> )	25.5 ± 2.7	25.4 ± 2.2	25.8 ± 2.2	0.89
Residency in La Rinconada (years)	11 [10–16]	15 [10–30]	15 [14–25]	0.21
Occupation: Miners (%)	13 (100%)	14 (100%)	11 (79%)	0.16
SpO <sub>2</sub> at inclusion (%)	77 ± 5	79 ± 4	79 ± 4	0.15
Capillary screening [Hb] (g·dL <sup>-1</sup> )	23.0 ± 1.2	23.1 ± 1.9	23.2 ± 1.7	0.97
CMS severity at inclusion				
Mild	13 (100%)	11 (79%)	13 (93%)	0.16
Moderate-to-severe	0 (0%)	3 (21%)	1 (7%)	
FVC (% predicted Andean value)	92 ± 17	90 ± 13	90 ± 15	0.88
FEV <sub>1</sub> (% predicted Andean value)	89 ± 15	85 ± 13	82 ± 16	0.52
Systolic ABP (mmHg)	117 ± 15	113 ± 11	121 ± 11	0.21
Diastolic ABP (mmHg)	78 ± 16	71 ± 12	75 ± 9	0.40

Continuous data are reported in mean ±SD or median [25th–75th percentiles]. Categorical data are reported in absolute count and percentage (%).

SpO<sub>2</sub>, transcutaneous oxygen saturation; [Hb], hemoglobin concentration; CMS, chronic mountain sickness; FVC, forced vital capacity; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in the first second; ABP, arterial blood pressure.

Variables	Acetazolamide (N = 13)			Atorvastatin (N = 14)		
	BL	W3	p-value	BL	W3	p-value
Venous Hct (%)	73.3 ± 6.4	69.3 ± 5.7	0.004	71.4 ± 6.6	69.9 ± 6.5	0.13
Venous [Hb] (g·dL <sup>-1</sup> )	23.8 ± 1.8	23.2 ± 2.0	0.003	23.2 ± 2.1	23.0 ± 2.0	0.32
MCHC (g·dL <sup>-1</sup> )	32.5 ± 1.1	33.5 ± 1.6	0.14	32.5 ± 1.3	32.9 ± 1.1	0.40
CMS total score	8 ± 1	6 ± 2	0.03	8 ± 2	7 ± 3	0.05
CMS clinical score	5 ± 1	3 ± 2	0.02	5 ± 2	4 ± 2	0.05
Serum creatinine level (μmol·L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	61 ± 15	62 ± 11	0.69	56 ± 11	63 ± 13	0.07
Serum potassium level (mEq·L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	3.9 ± 0.4	3.8 ± 0.4	0.62	3.9 ± 0.3	3.8 ± 0.4	0.84
EPO (mU·mL <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	23.7 [20.6–34.4]	16.8 [10.2–39.0]	0.06	21.0 [16.6–60.6]	19.7 [3.6–26.3]	0.69
sTfR (mg·L <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	1.60 ± 0.78	1.16 ± 0.55	0.16	1.93 ± 1.22	2.32 ± 1.14	0.16

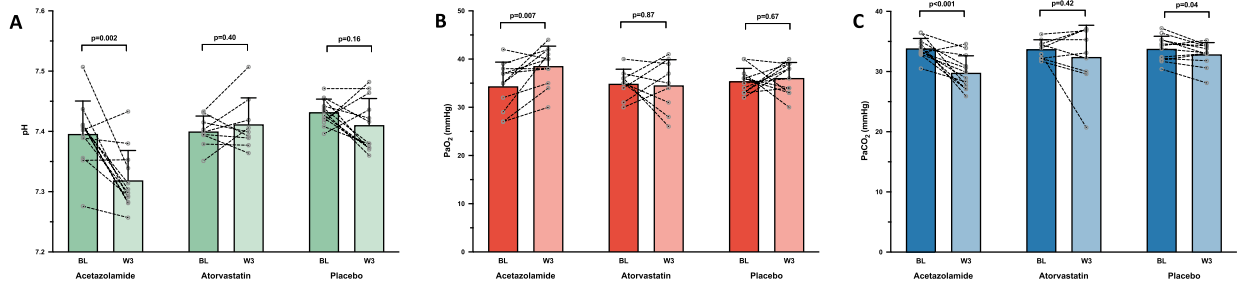
Continuous data are reported in mean ±SD or median [25th–75th percentiles]. Categorical data are reported in absolute count and percentage. BL, baseline; W3, 3 weeks; Hct, hematocrit; [Hb], hemoglobin concentration; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; CMS, chronic erythropoietin; sTfR, serum concentration of soluble transferrin receptor.

<sup>a</sup> N = 13/13 (ACZ), N = 13/14 (Atorvastatin), N = 12/14 (Placebo).

<sup>b</sup> N = 11/13 (ACZ), N = 10/14 (Atorvastatin), N = 13/14 (Placebo); p-values for EPO are obtained from log<sub>e</sub>-transformed values to meet normality.

<sup>c</sup> N = 5/13 (ACZ), N = 9/14 (Atorvastatin), N = 7/14 (Placebo).

5



**Fig. 1** Changes in arterial blood gases. Mean values with standard deviation and individual variations in arterial pH (A), arterial partial pressure of oxygen [PaO<sub>2</sub>] (B) and arterial partial pressure of carbon dioxide [PaCO<sub>2</sub>] (C), measured at baseline (BL) and after 3 weeks of treatment (W3) by acetazolamide ( $N = 12/13$ ), atorvastatin ( $N = 9/14$ ) or placebo ( $N = 12/14$ ), in chronic mountain sickness highlanders permanently living in La Rinconada (5100–5300 m).

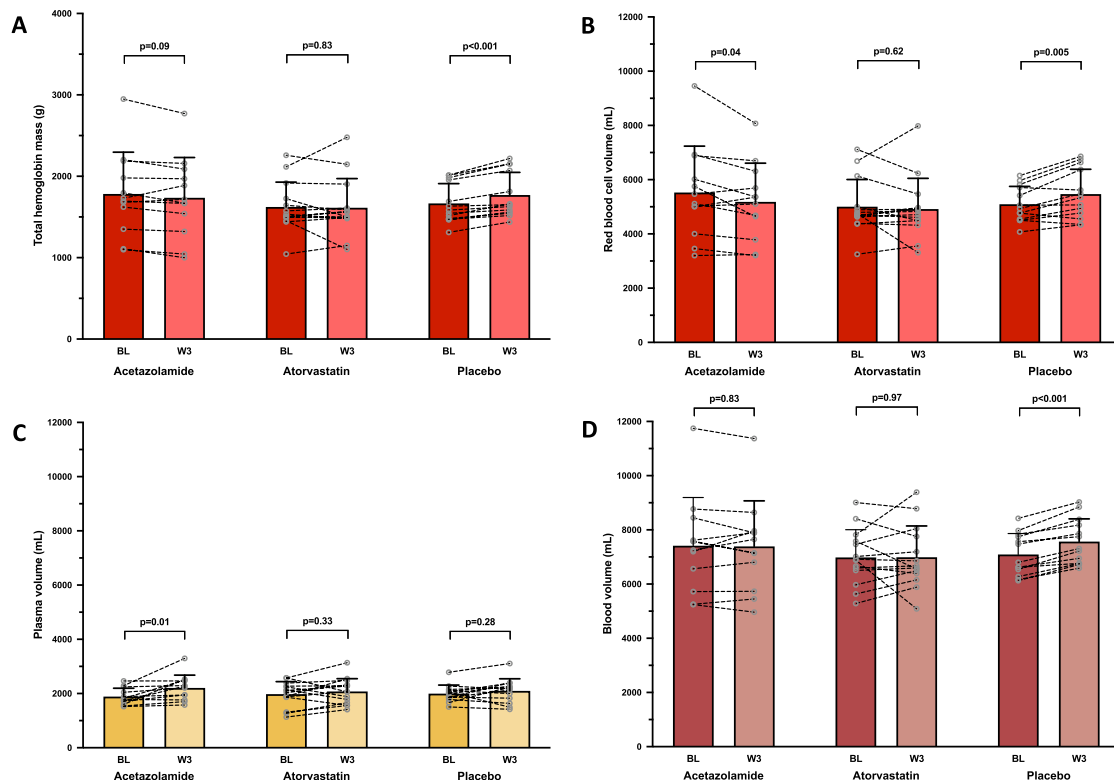
### Drugs tolerance

After a 3-week period of drug administration, the proportion of participants who complained about specific symptoms such as paresthesia, headache, increased diuresis and muscle or joint soreness did not statistically differ among the groups (data not shown). Furthermore, no significant changes in either serum potassium or in creatinine levels

were highlighted during the short-period of treatment (Table 2).

### Discussion

This study assessing the early efficacy and hematological changes induced by drugs potentially improving CMS



**Fig. 2** Changes in intravascular volumes. Mean values with standard deviation and individual variations in total hemoglobin mass (A), red blood cell volume (B), plasma volume (C) and total blood volume (D) measured at baseline (BL) and after 3 weeks of treatment by acetazolamide ( $N = 12/13$ ), atorvastatin ( $N = 14/14$ ) or placebo ( $N = 13/14$ ), in chronic mountain sickness highlanders permanently living in La Rinconada (5100–5300 m).

condition highlights 1) the early efficacy of ACZ to reduce Hct (and [Hb]), even at an extreme altitude > 5000 m and 2) the underlying changes in intravascular volumes. In the ACZ group, the early decrease in Hct observed in the present study was comparable to previous results in highlanders albeit living at an altitude ~1000 m lower.<sup>13–15</sup> As expected, and previously shown,<sup>12–15</sup> ACZ administration stimulated ventilation and improved oxygenation, mainly consecutively to a mild metabolic acidosis induced by the inhibition of renal tubular carbonic anhydrase<sup>26</sup> and without any identified significant side-effects (e.g., hypokalemia). The relative rise in PaO<sub>2</sub> observed in the ACZ group (+13%) was similar to previously observed by others ~1000 m of altitude lower.<sup>15</sup> Despite the absence of any significant change in Hct, decreases in CMS severity scores in the placebo and atorvastatin groups were almost similar than those observed in the ACZ group (Table 2). A similar placebo effect has previously been observed<sup>13</sup> and might be, in part, explained by the difficult and subjective evaluation of the symptoms (and their intensity) in CMS population, where the relationship between symptoms' severity and Hct (or [Hb]) can be inconsistent in cross-sectional studies.<sup>22,27,28</sup>

In accordance with our hypothesis regarding the effect of ACZ on intravascular volumes in highlanders, the significant increase in PV and the strong correlation between this increase and the decrease in Hct, suggested that the early decrease in Hct was not solely mediated by a decrease in erythrocytosis, but also by fluid regulation leading to an increase in PV, albeit the correlation between Hct and calculated intravascular volumes should be interpreted with caution due to a between-variable dependency. While a decrease in PV could have been expected due to the mild diuretic effect of ACZ,<sup>29</sup> this intriguing finding seems in line with previous results observed in a rodent model of chronic hypoxia exposure.<sup>16</sup> In this experimental study, ACZ-treated rats during exposure to chronic hypoxia exhibited no significant change in PV compared to normoxic controls, while non-treated hypoxic controls showed the more classically expected hypoxic PV contraction. In lowlanders, reduction in PV is a well-known and rapid physiological response to high-altitude exposure (allowing an increase in arterial oxygen content) with a prompt recovery of PV upon reoxygenation.<sup>30</sup> The exact underlying mechanism(s) of the early PV expansion under ACZ therapy observed in our study in CMS highlanders remain(s) to be investigated but may involve, at least in part, an activation of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) possibly mediated by the oxygenation improvement.<sup>16</sup> In Andeans, PV contraction has been shown to contribute, together with an increase in Hb<sub>mass</sub>, to the CMS polycythemia<sup>31,32</sup> and is associated with a decrease in RAAS activity.<sup>31</sup> Furthermore, we previously showed that CMS and non-CMS highlanders in La Rinconada had similar Hb<sub>mass</sub> but that CMS highlanders tended to have a smaller PV, with an inverse relationship between CMS symptoms and PV.<sup>22</sup> Taking together, these results support the potential implication of PV in CMS pathophysiology as well as a potential therapeutic target.

The apparent discrepancy between the significant decrease in RBCV (which also correlated with the decrease in Hct) and the non-significant decrease in Hb<sub>mass</sub> (Fig. 2A

and 2B) in the ACZ group could be explained by the small sample size coupled with some inter-individual variability. The more pronounced decrease in RBCV than in Hb<sub>mass</sub> may also reflect a reduction in reticulocyte and young RBC counts (which have a greater volume than mature and older RBCs<sup>33</sup>) secondary to the onset of erythropoiesis decline, as suggested by the decreasing trend in plasma EPO level (Table 2). Nevertheless, EPO concentrations must be interpreted cautiously due to a large variability, especially in CMS patients.<sup>34</sup> The absence of a complete blood count including reticulocyte count in this study does not allow us to confirm this hypothesis.

At last, the significant increase in Hb<sub>mass</sub> in the placebo group during this short-term study was unexpected and remains unexplained. Similarly, without any associated measurement of the RAAS activity, the absence of concomitant contraction of PV to keep BV constant could not be explained. Participants were well-balanced among the treatment groups and resided at the same altitude (*i.e.*, between 5100 and 5300 m) during the 3-week period. A measurement error seems unlikely for various reasons. First, identical and rigorous CO-rebreathing method was applied at both time-points (see Supplementary Methods) and second, similar pre-measurement fraction of venous carboxyhemoglobin (%HbCO) between the two time-points (eTable 2), allowing us to exclude any drift in %HbCO measurement during the study period. Furthermore, the significant decrease in absolute change in %HbCO during the CO-rebreathing measurement between W3 and BL in the placebo group only (eTable 2) was concordant with the increase in Hb<sub>mass</sub>, which was also concomitant with the increasing trend in sTfR (Table 2), suggesting a higher erythropoietic activity.<sup>24</sup> Although none of subjects included reported any recent prolonged stay at lower altitude and had similar professional activities and life habits, we cannot exclude the fact that some of them may have spent some days at lower altitude (*e.g.* weekend in Juliaca, 3800 m) or may have been exposed to higher levels of hypoxia during their mining activities. However, the randomized double-blinded study design makes a systematic recruitment bias in one arm unlikely and suggests that differences between groups reflect the effect of the treatment.

Several limitations should be acknowledged. Due to the COVID-19 pandemic and lockdowns, we were not able to proceed with the pre-planned long-term reassessment. As a consequence, we could not determine if a significant Hb<sub>mass</sub> reduction would occur later in the ACZ or statin groups and we could not evaluate the potential long-term effects of the drugs (especially atorvastatin) on secondary outcomes such as vascular reactivity or oxidative-nitrosative stress.<sup>7</sup> The good tolerance and efficacy of ACZ remains to be confirmed over a longer period, even if it has previously been demonstrated up to 6 months albeit at lower altitude.<sup>14</sup> Furthermore, mechanisms underlying the early change in PV such as the RAAS activity remain to be elucidated.<sup>31</sup> Finally, conducting drug-studies exclusively in male CMS, as in the present study and others,<sup>12–15</sup> may restrain the generalizability of results to female CMS, who are also affected by CMS, albeit with a much lower prevalence, at least before menopause.<sup>2,3</sup> Studies conducted in female CMS sufferers are unfortunately lacking.

## Conclusions

In summary, 3 weeks of ACZ administration significantly improved oxygenation and reduced Hct in CMS highlanders living at extreme altitude > 5000 m. This early effect on Hct was correlated with both an increase in PV and a decrease in RBCV. Atorvastatin uptake had no effect on hematological parameters after 3 weeks of treatment but longer-term beneficial effects on vascular function may be expected.<sup>17</sup> Further studies are required to understand the mechanisms of the ACZ-induced PV increase as well as to determine the role of changes in PV in the adaptive or maladaptive hematological responses to chronic hypoxia in high-altitude dwellers.

## Data sharing statement

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Trial registration

ClinicalTrials.gov identifier: NCT04251364

## Authors' contribution

BC, ES, PR, SD, CAH, AP, AASG, IH, DG, JVB, PC, AP and SV designed the study and/or acquired the data. BC performed the statistical analysis. BC, ES, PR, SD, JVB, PC, AP and SV analyzed and interpreted the data. BC and SV wrote the manuscript; ES, PR, SD, CAH, AP, AASG, IH, DG, JVB, PC and AP revised it critically for important intellectual content. All authors gave final approval and agreed to be accountable for all aspects of work ensuring integrity and accuracy.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare no competing financial interests.

## Funding support

This study was supported by the Grenoble Alpes University foundation, the "Fonds de dotation AGIR pour les maladies chroniques", the Air Liquide Foundation and by the French National Research Agency (ANR-12-TECS-0010) in the framework of the "Investissements d'avenir" program (ANR-15-IDEX-02).

## Acknowledgements

The authors would like to thank Blandine Deschamps (RN) for her expert technical assistance during the study, the medical students of the scientific association of medical students from the Altiplano University (Puno, Peru) who actively contributed to the research program implemented in La Rinconada, Detalo Instruments (Prof. Carsten Lundby) for support with the OpCO system and Severine Lambing and Vincent

Rocher from Radiometer France for their excellent technical assistance.

## Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.pulmo.2023.05.006.

## References

1. Tremblay JC, Ainslie PN. Global and country-level estimates of human population at high altitude. *Proc National Acad Sci*. 2021;118(18):e2102463118.
2. Villafuerte FC, Corante N. Chronic mountain sickness: clinical aspects, etiology, management, and treatment. *High Alt Med Biol*. 2016;17(2):61–9.
3. Villafuerte FC, Simonson TS, Bermudez D, León-Velarde F. High-altitude erythrocytosis: mechanisms of adaptive and maladaptive responses. *Physiology*. 2022;37(4):175–86.
4. León-Velarde F, Maggiorini M, Reeves JT, et al. Consensus statement on chronic and subacute high altitude diseases. *High Alt Med Biol*. 2005;6(2):147–57.
5. Rimoldi SF, Rexhaj E, Pratali L, et al. Systemic vascular dysfunction in patients with chronic mountain sickness. *Chest*. 2012;141(1):139–46.
6. Tremblay JC, Hoiland RL, Howe CA, et al. Global REACH 2018: high blood viscosity and hemoglobin concentration contribute to reduced flow-mediated dilation in high-altitude excessive erythrocytosis. *Hypertension*. 2019;73(6):1327–35.
7. Bailey DM, Rimoldi SF, Rexhaj E, et al. Oxidative-nitrosative stress and systemic vascular function in highlanders with and without exaggerated hypoxemia. *Chest*. 2013;143(2):444–51.
8. Penalzoza D, Arias-Stella J. The heart and pulmonary circulation at high altitudes. *Circulation*. 2007;115(9):1132–46.
9. Doutreleau S, Ulliel-Roche M, Hancoo I, et al. Cardiac remodeling in the highest city in the world: effects of altitude and chronic mountain sickness. *Eur J Prev Cardiol*. 2022;29(17):2154–62.
10. Rivera-Ch M, León-Velarde F, Huicho L. Treatment of chronic mountain sickness: critical reappraisal of an old problem. *Resp Physiol Neurobiol*. 2007;158(23):251–65.
11. Macarlupú JL, Vizcardo-Galindo G, Figueroa-Mujica R, Voituron N, Richalet J, Villafuerte FC. Sub-maximal aerobic exercise training reduces haematocrit and ameliorates symptoms in Andean highlanders with chronic mountain sickness. *Exp Physiol*. 2021;106(11):2198–209.
12. Rivera-Ch M, Huicho L, Bouchet P, Richalet JP, León-Velarde F. Effect of acetazolamide on ventilatory response in subjects with chronic mountain sickness. *Resp Physiol Neurobiol*. 2008;162(3):184–9.
13. Richalet J-P, Rivera M, Bouchet P, et al. Acetazolamide: a treatment for chronic mountain sickness. *Am J Resp Crit Care*. 2005;172(11):1427–33.
14. Richalet J-P, Rivera-Ch M, Maignan M, et al. Acetazolamide for Monge's Disease. *Am J Resp Crit Care*. 2008;177(12):1370–6.
15. Sharma S, Gralla J, Ordonez JG, et al. Acetazolamide and N-acetylcysteine in the treatment of chronic mountain sickness (Monge's disease). *Resp Physiol Neurobiol*. 2017;246:1–8.
16. Pichon A, Connes P, Quidu P, et al. Acetazolamide and chronic hypoxia: effects on haemorrhology and pulmonary haemodynamics. *Eur Respir J*. 2012;40(6):1401–9.
17. Yu D, Liao JK. Emerging views of statin pleiotropy and cholesterol lowering. *Cardiovasc Res*. 2021;118(2):413–23.

18. Amaru R, Villarroel M, Miguez H, et al. Hematopoietic progenitor cells from patients with chronic mountain sickness lack the JAK2V617F mutation, show hypersensitivity to erythropoietin and are inhibited by statins. *Blood*. 2009;114(22):1894.
19. Enserink M. Hypoxia city. *Science*. 2019;365(6458):1098–103.
20. Champigneulle B, Hanco I, Renan R, et al. High-altitude environment and COVID-19: sARS-CoV-2 seropositivity in the highest city in the world. *High Alt Med Biol*. 2021. <https://doi.org/10.1089/ham.2021.0020>. Online ahead of print.
21. Jové ORL, Arce SC, Chávez RW, et al. Spirometry reference values for an andean high-altitude population. *Resp Physiol Neurobiol*. 2018;247:133–9.
22. Oberholzer L, Lundby C, Stauffer E, et al. Reevaluation of excessive erythrocytosis in diagnosing chronic mountain sickness in men from the world's highest city. *Blood*. 2020;136(16):1884–8.
23. Siebenmann C, Keiser S, Robach P, Lundby C. CORP: the assessment of total hemoglobin mass by carbon monoxide rebreathing. *J Appl Physiol*. 2017;123(3):645–54.
24. Pasricha S-R, Tye-Din J, Muckenthaler MU, Swinkels DW. Iron deficiency. *Lancet*. 2021;397(10270):233–48.
25. Stauffer E, Loyrion E, Hanco I, et al. Blood viscosity and its determinants in the highest city in the world. *J Physiology*. 2020;598(18):4121–30.
26. Swenson ER. Carbonic anhydrase: mechanism, regulation, links to disease, and industrial applications. *Subcell Biochem*. 2013;75:361–86.
27. Gonzales GF, Rubio J, Gasco M. Chronic mountain sickness score was related with health status score but not with hemoglobin levels at high altitudes. *Resp Physiol Neurobiol*. 2013;188(2):152–60.
28. Hanco I, Bailly S, Baillieu S, et al. Excessive erythrocytosis and chronic mountain sickness in dwellers of the highest city in the world. *Front Physiol*. 2020;11:773.
29. Swenson ER. Pharmacology of acute mountain sickness: old drugs and newer thinking. *J Appl Physiol*. 2016;120(2):204–15.
30. Siebenmann C, Robach P, Lundby C. Regulation of blood volume in lowlanders exposed to high altitude. *J Appl Physiol*. 2017;123(4):957–66.
31. Steele AR, Tymko MM, Meah VL, et al. Global REACH 2018: volume regulation in high-altitude Andeans with and without chronic mountain sickness. *Am J Physiology-regulatory Integr Comp Physiol*. 2021;321(3):R504–12.
32. Schmidt WFJ, Wachsmuth N, Jimenez J, Soria R. Hemoglobin mass and blood volume in patients with altitude-related polycythemia. *Front Physiol*. 2022;13:867108.
33. Piva E, Brugnara C, Spolaore F, Plebani M. Clinical utility of reticulocyte parameters. *Clin Lab Med*. 2015;35(1):133–63.
34. Villafuerte FC, Macarlupú JL, Anza-Ramírez C, et al. Decreased plasma soluble erythropoietin receptor in high-altitude excessive erythrocytosis and chronic mountain sickness. *J Appl Physiol*. 2014;117(11):1356–62.

# Supplementary material

## Supplemental methods

### Hematocrit measurement

Venous hematocrit (Hct, %) was measured by the microcentrifuge method using a dedicated portable centrifuge (HemataSTAT II, Separation Technology Inc., Sandford, USA). All Hct measurements were performed in duplicate by a single investigator, just prior to starting the CO-rebreathing. Intra-assay coefficient of variation (CV) for Hct measurement during the study was 0.8%.

### Hemoglobin measurement

Venous hemoglobin concentration ([Hb], g·dL<sup>-1</sup>) was measured using an ABL-80 OSM co-oximeter (Radiometer, Copenhagen, Denmark). All [Hb] measurements were done in triplicate by a single investigator, just prior to starting the CO-rebreathing. Intra-assay CV for [Hb] measurement during the study was 1.2%.

### Carbon monoxide (CO) rebreathing

The high diffusion capacity and strong affinity for hemoglobin of the carbon monoxide (CO) allow to use it as a hemoglobin marker to quantify the total hemoglobin mass (Hb<sub>mass</sub>), using the dilution principle with a high precision.<sup>286</sup> In a test-retest measurement conducted on lowlanders (n=6), six weeks apart, we obtained a typical measurement error (%TE)<sup>287</sup> of 2.4%, consistent with the %TE of 1.9% previously reported with the same methodology.<sup>288</sup> To avoid any inter-operator bias, all measurements were conducted by the same trained and experimented operator, using an automated system (OpCO, Detalo Health, Copenhagen, Denmark) which allows to minimize the risk of error during the measurement through the automatization of the successive steps.<sup>286,289,290</sup>

The CO rebreathing was performed after a 10-min supine rest period, with a slight elevation of the legs, to facilitate venous return and thus a homogeneous CO distribution during the procedure.<sup>286</sup> All instructions to the participant were given in Spanish. Briefly, the participant was asked to breathe through a mouthpiece (with a nose clip) in a closed circuit. After a 2-min period of 100% oxygen (O<sub>2</sub>) breathing, a peripheral heparinized venous blood sample was

obtained from the antecubital vein and immediately analyzed to measure Hct and [Hb] (see above) and the pre-percentage of carboxyhemoglobin (%HbCO<sub>PRE</sub>), in triplicate, using the ABL-80 co-oximeter (Radiometer, Copenhagen, Denmark).<sup>291</sup> Our ABL-80 co-oximeter was revised by the manufacturer right before shipping to Peru (including external quality controls). A calibration of the spectrometer was done on site before starting the first measurements at 5,100 m, using the ctHb calibration solution S7770. During the study period, internal quality controls were automatically executed every 8 hours.

During the study period, the global intra-assay CV for %HbCO measurement was 2.8%. Even if the Radiometer co-oximeters (ABL-80 and ABL-90) are not specifically validated by the manufacturer to be used in high-altitude places (respectively above 2,290 and 4,000 m), they have both been extensively used above 4,000 m by us as well as others, to measure Hb<sub>mass</sub> and arterial blood gases in previous research projects.<sup>120,187,188</sup>

After the determination of %HbCO<sub>PRE</sub>, a bolus dose of 1.5 mL CO per kg body mass was administered into the rebreathing circuit while the participant continued to breath 100% O<sub>2</sub>. A soda-lime container allowed the absorption of exhaled CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> was periodically supplied into the circuit. Considering that CO mixing-time could be prolonged in chronic mountain sickness (CMS) highlanders as emphasized recently,<sup>292</sup> we used a 14-min rebreathing period in the present study including CMS patients with large Hb<sub>mass</sub>.

At the end of the CO-rebreathing period, another venous blood sample was obtained, to measure the post %HbCO (%HbCO<sub>POST</sub>) and, thus, to calculate the absolute change in %HbCO during the procedure:  $\Delta\text{HbCO} = \% \text{HbCO}_{\text{POST}} - \% \text{HbCO}_{\text{PRE}}$ .

The CO volume absorbed (VCO<sub>abs</sub>) was deducted from the measured residual CO volume retained in the close-rebreathing circuit. The number of CO molecules absorbed (nCO<sub>abs</sub>, in moles) was calculated using Equation 1 and the number of Hb molecules tagged by CO (nHb<sub>tag</sub>, in moles) was deduced from Equation 2, considering that 1 mol of Hb binds 4 mol of CO.<sup>286</sup> Therefore, the total number of Hb (nHb<sub>total</sub>) was calculated from Equation 3 and Hb<sub>mass</sub> (in grams) was deducted from Equation 4.<sup>286</sup>

Equation 1:  $n\text{CO}_{\text{abs}} = P_{\text{atm}} \times V\text{CO}_{\text{abs}} / (R \times T)$ , where R is the ideal gas constant (0.08206 atm/(mol·K)); T, the temperature in Kelvin; VCO<sub>abs</sub> is expressed in liters and P<sub>atm</sub>, the atmospheric pressure expressed in atmospheres.

Equation 2:  $n\text{Hb}_{\text{tag}} = n\text{CO}_{\text{abs}} / 4$

Equation 3:  $n\text{Hb}_{\text{total}} = (n\text{Hb}_{\text{tag}} / \Delta\text{HbCO}) \times 100$

Equation 4:  $\text{Hb}_{\text{mass}} = n\text{Hb}_{\text{total}} \times 6.44 \times 10^4$

From the measured  $Hb_{\text{mass}}$ , and using the values of Hct and [Hb], the intravascular volumes (in liters) were derived as follows without any correction factor<sup>286</sup>:

- Red blood cell volume (RBCV):  $RBCV = Hb_{\text{mass}} \times Hct/[Hb]$
- Blood volume (BV):  $BV = RBCV/Hct$
- Plasma volume (PV):  $PV = BV - RBCV$

In two patients (one from the ACZ group and one from the placebo group), CO leaks during the baseline measurements led to aberrant  $Hb_{\text{mass}}$  values. Therefore, these patients were excluded from the analyses.

### **Arterial blood gases and on-site blood chemistry measurements**

All these measurements were performed by an experienced anesthesiologist. From a heparinized arterial blood sample obtained *via* a radial artery puncture (BD Preset™ syringe with Eclipse™ safety 23G needle, ref. 364391), arterial blood gases (pH, PaO<sub>2</sub> in mmHg, PaCO<sub>2</sub> in mmHg) were immediately measured using the i-STAT portable blood gas analyzer (i-STAT, Abbott Point of Care, Princeton, New Jersey, USA), with the G3+ cartridge. The CVs reported by the manufacturer were <1% for pH, 4.8% for PO<sub>2</sub> and 2.5% for PaCO<sub>2</sub> (i-STAT G3+ Cartridge manual, revision date: 16-Sep-2020).

As the i-STAT does not include a co-oximeter, the given value of arterial oxygenation saturation (SaO<sub>2</sub>) is calculated from a standard equation and cannot be measured. Since a significant discrepancy has been previously described between measured and calculated SaO<sub>2</sub> with the i-STAT when PaO<sub>2</sub> is below to 50 mmHg,<sup>293</sup> we chose not to report this parameter. According to the manufacturer manual, the atmospheric pressure sensor incorporated in the i-STAT allows for the calibration of the PO<sub>2</sub> sensor within an atmospheric pressure between 300 and 850 mmHg. Mean ( $\pm$  SD) atmospheric pressure measured daily in La Rinconada at 5,100 m during the study period was  $418.3 \pm 0.5$  mmHg. More generally, the use of i-STAT devices has been previously reported in other high-altitude research projects.<sup>294-296</sup>

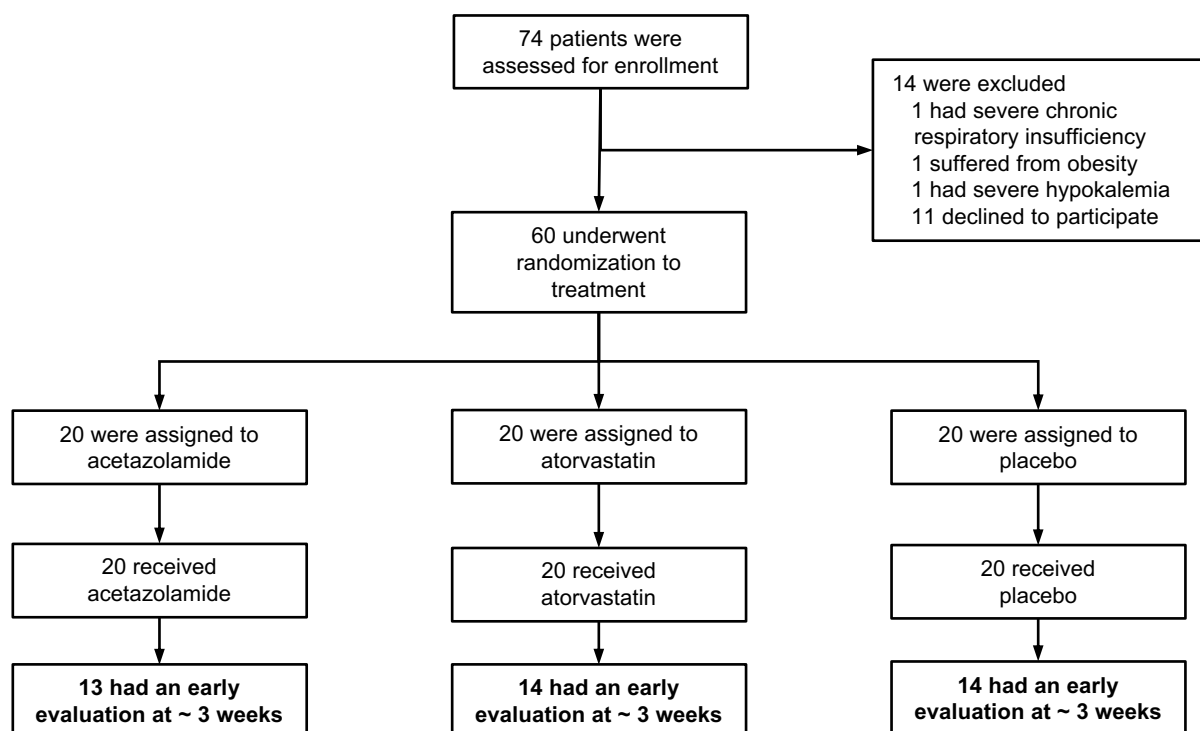
From the same heparinized blood sample as the one used to measure arterial blood gases, chemistry measurements, including serum potassium (mEq·L<sup>-1</sup>) and creatinine ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) levels, were performed using the CHEM8+ cartridge for the i-STAT. The CV reported by the manufacturer were 1.3% for potassium and 4.8% for creatinine tests, respectively (i-STAT CHEM8+ Cartridge manual, revision date: 25-Feb-2020).

## Serum analyses

Serum samples were obtained from a venous blood sample collected through a venous antecubital puncture performed at rest and in supine position, using an 18G butterfly needle system and vacutainer tubes (Becton-Dickinson, Le Pont-de-Claix, France). Blood samples were quickly centrifugated, before serum was aliquoted and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Frozen samples were transported to Juliaca (Peru) by car, then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ , before being shipped back to France in a temperature-controlled container for further analyses.

In the biochemical laboratory of the Grenoble University Hospital, analyzes were conducted after a single freeze-thaw cycle. Serum concentrations of erythropoietin were analyzed with an ELISA kit (Quantikine IVD ELISA Human Erythropoietin, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in duplicates and the two values averaged. Serum concentrations of soluble transferrin receptor (sTfR) were determined in singlicate with an immunoturbidimetric assay (Atellica<sup>®</sup> Solution, Siemens Healthineers).

**eFigure 1.** Flow chart of the study.



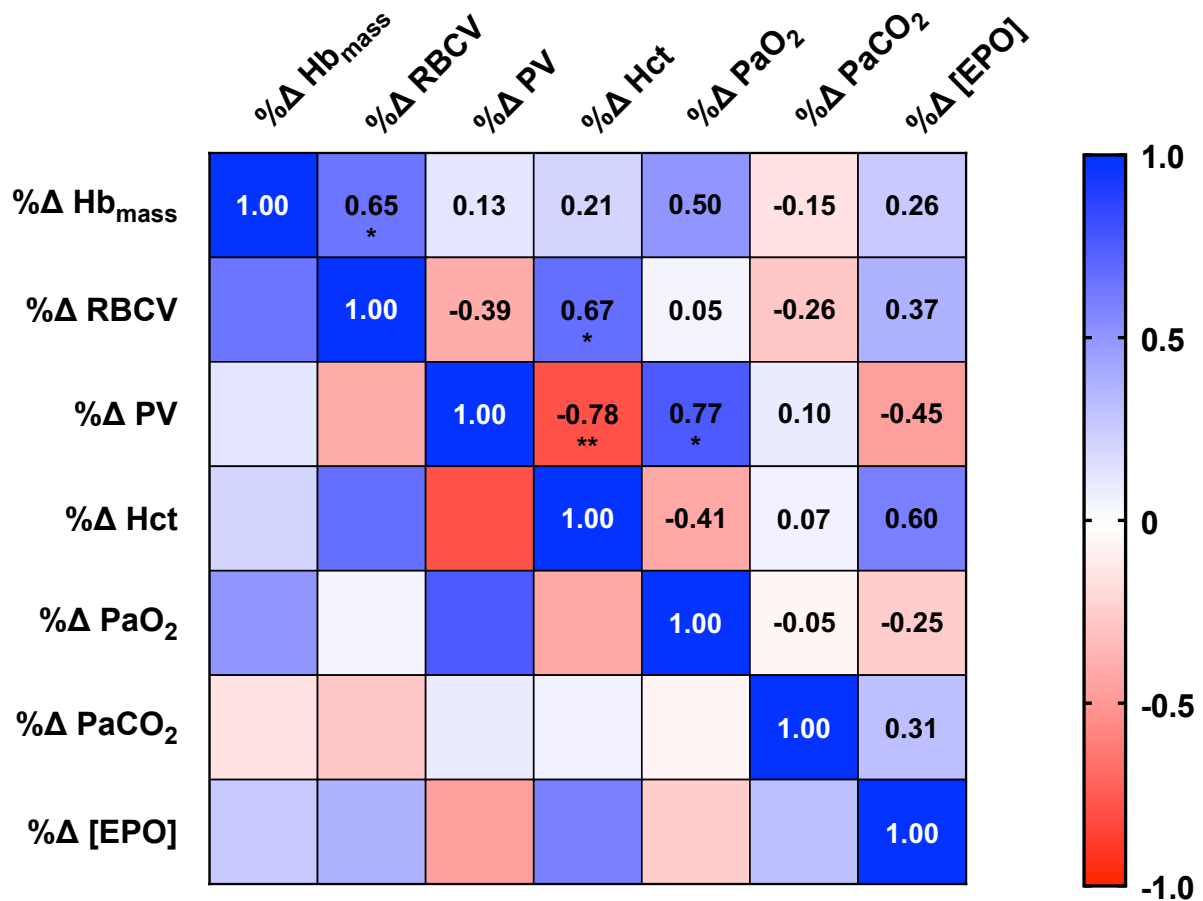
**eTable 1.** Comparison of the baseline characteristics between the 41 (68%) CMS highlanders reassessed after 3 weeks of treatment (included in the present study) and the 19 (32%) participants without early reassessment (non-included in the present study).

Variables	Early reassessed CMS highlanders (N=41)	Non-early reassessed CMS highlanders (N=19)	<i>p</i> -value
Age (years)	46 ± 7	46 ± 7	0.91
Body mass index (kg·m <sup>2</sup> )	25.6 ± 2.3	24.8 ± 1.7	0.19
Residency in La Rinconada (years)	15 [10-20]	15 [8-24]	0.69
Occupation: Miners (%)	38 (93%)	16 (84%)	0.51
SpO <sub>2</sub> at inclusion	78 ± 4	80 ± 5	0.18
FVC (% predicted Andean value)	90 ± 14	97 ± 16	0.15
FEV <sub>1</sub> (% predicted Andean value)	85 ± 15	94 ± 16	0.04
Systolic ABP (mmHg)	117 ± 12	113 ± 17	0.32
Diastolic ABP (mmHg)	75 ± 13	70 ± 13	0.22
Venous Hct (%)	72.1 ± 5.6	70.0 ± 5.7	0.18
Venous [Hb] (g·dL <sup>-1</sup> )	23.5 ± 1.8	23.0 ± 1.5	0.28
CMS total score	8 ± 2	9 ± 3	0.55
CMS clinical score	5 ± 2	6 ± 3	0.55
CMS severity			
Mild (CMS total score 6-10)	37 (90%)	17 (90%)	
Moderate (CMS total score 11-14)	3 (7%)	1 (5%)	0.81
Severe (CMS total score ≥15)	1 (3%)	1 (5%)	
Arterial pH	7.41 ± 0.04	7.40 ± 0.04	0.36
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	34.8 ± 3.5	36.6 ± 5.1	0.13
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	33.8 ± 2.2	33.2 ± 3.2	0.47
Total hemoglobin mass (g)	1686 ± 362	1736 ± 396	0.64
RBC volume (mL)	5194 ± 1174	5280 ± 1234	0.80
Plasma volume (mL)	1956 ± 367	2209 ± 491	0.03
Blood volume (mL)	7151 ± 1224	7490 ± 1396	0.36

Continuous data are reported in mean ± SD or median [25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles] according to the normality of distribution and compared using t-test or Man-Whitney test, as appropriate. Categorical data are reported in absolute count and percentage (%) and compared using a Fischer exact test.

SpO<sub>2</sub>, transcutaneous oxygen saturation; FVC, forced vital capacity; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in the first second; ABP, arterial blood pressure; Hct, hematocrit; [Hb], hemoglobin concentration; CMS, chronic mountain sickness; PaO<sub>2</sub>, arterial partial pressure of oxygen; PaCO<sub>2</sub>, arterial partial pressure of carbon dioxide; RBC, Red blood cell.

**eFigure 2.** Correlation matrix (Spearman coefficients) between percentage change (% $\Delta$ ) over the study period, in measured total hemoglobin mass ( $Hb_{mass}$ ), derived intravascular volumes (RBCV, red blood cell volume; PV, plasma volume), arterial blood gases ( $PaO_2$ ,  $PaCO_2$ ), serum erythropoietin level ([EPO]) and hematocrit (Hct) in the acetazolamide group. \* p-value <0.05, \*\* p-value <0.01.



**eTable 2.** Fraction of venous carboxyhemoglobin measured pre (%HbCO<sub>PRE</sub>) and absolute change in fraction of venous carboxyhemoglobin after the carbon monoxide rebreathing ( $\Delta$ HbCO= %HbCO<sub>POST</sub> - %HbCO<sub>PRE</sub>), at baseline (BL) and after 3 weeks (W3) of treatment.

		<b>BL</b>	<b>W3</b>	<b><i>p</i>-value</b>
<b>All groups</b>	%HbCO <sub>PRE</sub>	1.33 [1.18-1.62]	1.25 [1.08-1.90]	0.40
	$\Delta$ HbCO	4.24 $\pm$ 0.95	4.13 $\pm$ 0.98	0.33
<b>ACZ group</b>	%HbCO <sub>PRE</sub>	1.30 [1.17-2.61]	1.13 [1.00-1.68]	0.51
	$\Delta$ HbCO	4.03 $\pm$ 1.16	4.20 $\pm$ 1.27	0.50
<b>Atorvastatin group</b>	%HbCO <sub>PRE</sub>	1.37 [1.20-2.03]	1.33 [1.13-2.47]	0.30
	$\Delta$ HbCO	4.35 $\pm$ 1.05	4.24 $\pm$ 1.04	0.59
<b>Placebo group</b>	%HbCO <sub>PRE</sub>	1.23 [0.94-1.48]	1.22 [1.10-1.76]	0.26
	$\Delta$ HbCO	4.31 $\pm$ 0.60	3.96 $\pm$ 0.56	0.003

Data are reported in median [25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup>] or in mean  $\pm$  SD according to the normality of distribution (Shapiro-Wilk testing) and compared with a Wilcoxon matched-pairs signed-rank test or a paired t-test as appropriate. *BL*, baseline; *W3*, 3 weeks; *ACZ*, acetazolamide; %HbCO<sub>PRE</sub>, pre carbon monoxide rebreathing fraction of venous carboxyhemoglobin;  $\Delta$ HbCO, absolute change in fraction of venous carboxyhemoglobin after the carbon monoxide rebreathing.

## **7 Perspectives de recherche**

Plusieurs axes de réflexion et perspectives de recherche peuvent être dégagés à partir des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse et plus largement à partir des travaux conduits au sein du programme de recherche Expédition 5300 depuis 2019.

### **7.1 Un besoin d'études longitudinales**

Tout d'abord, comme nous l'avons observé dans l'étude 1 de ce travail, l'augmentation de l'Hct, la majoration de l'hypoxémie et le développement du CMS sont progressifs au cours des années de résidence en haute altitude.<sup>252</sup> La conduite de futures études longitudinales, tant épidémiologiques que physiologiques, semble nécessaire pour confirmer ces observations mais également pour appréhender les mécanismes physiopathologiques sous-jacents ainsi que leurs dynamiques au cours du temps (évolution de la sensibilité de la réponse ventilatoire, apparition de troubles respiratoires du sommeil...) ou également pour évaluer l'effet de thérapeutiques sur le long terme. Le besoin et le manque d'études longitudinales dans l'étude de l'EE et du CMS est mis en avant par de nombreux auteurs.<sup>146,156,160,175,226,251</sup> En ce sens, les collaborations qui se développent entre notre équipe de recherche et les universités péruviennes (Universidad National del Altiplano de Puno, Universidad Peruana Cayetano Heredia de Lima), ainsi que le projet de création d'un centre de santé et de recherche sur la haute altitude permanent à La Rinconada, soutenu par les différentes institutions locales, devraient permettre, dans les années à venir, la conduite d'études longitudinales d'envergure à La Rinconada. Ces études semblent essentielles pour la compréhension des mécanismes, probablement dynamiques au cours du temps, aboutissant à l'EE et au CMS. Des études épidémiologiques semblent également nécessaires pour préciser la morbi-mortalité attribuable à l'EE et au CMS, notamment cardio et cérébro-vasculaire ; celles-ci font actuellement défaut dans la littérature.

### **7.2 Vers une redéfinition de l'EE et du CMS ?**

La définition actuelle de l'EE, définie par rapport à la valeur moyenne et à la distribution de la [Hb] observées à 4300 m à Cerro de Pasco (Pérou), dans un sous-groupe d'habitants jeunes

et en bonne santé, est aujourd'hui challengée par les valeurs observées à plus haute altitude à La Rinconada, chez des habitants ne présentant pas de signes ou symptômes de maladaptation.<sup>188</sup> Ces constatations et leur interprétation ont récemment été critiquées dans une revue conduite par des experts péruviens qui avaient été fortement impliqués dans le consensus de 2005.<sup>146</sup> Néanmoins, l'augmentation de la [Hb] suivant une relation linéaire avec l'altitude,<sup>118</sup> il semblerait licite de définir, d'un point de vue épidémiologique, une valeur seuil de [Hb], permettant de définir l'EE par zones d'altitude,<sup>175</sup> éventuellement associée, d'un point de vue physiologique, à la définition d'une valeur seuil de [Hb], indépendante de l'altitude, pouvant être considérée comme à risque d'entraîner une symptomatologie ou associée à une altération cardio-vasculaire (hypertension pulmonaire, remodelage cardiaque, altération de la fonction endothéliale systémique...).<sup>146</sup> De plus, l'association inconstamment retrouvée entre symptômes (et leur sévérité) et la [Hb] dans les études transversales,<sup>175,249</sup> ainsi que le décalage temporel que nous avons observé dans l'étude 1 entre l'augmentation de l'Hct au cours du temps passé en altitude et l'augmentation significative du score clinique de CMS questionnent sur l'ajout éventuel d'un critère de durée d'exposition à la haute altitude, ou de durée d'évolution d'une polyglobulie, dans la définition du CMS.

Par ailleurs, d'un point de vue physiologique, le lien entre l'augmentation de la [Hb] et les symptômes reste insuffisamment exploré, comme nous l'avons présenté en introduction de ce travail. Particulièrement, le lien entre l'augmentation de la viscosité sanguine et ses déterminants (par exemple la déformabilité des globules rouges) et les symptômes a peu, ou n'a pas encore, été étudié.<sup>151</sup> De la même manière, le rôle potentiel du PV dans l'augmentation de la [Hb] et le lien potentiel entre PV et sévérité des symptômes, tels que récemment suggérés, constituent des axes d'investigation à développer.<sup>120,186-188</sup>

Ainsi, un questionnement sur les définitions actuelles de l'EE et du CMS, telles que proposées par un consensus maintenant vieux de quasiment 20 ans, semble licite. En ce sens, les données épidémiologiques et physiologiques recueillies à la Rinconada depuis 2019 par notre équipe, chez plus de 200 habitants de haute altitude, devraient permettre, dans une analyse globale, de rechercher des associations statistiques entre la sévérité des signes et symptômes éventuellement présentés par les habitants de haute altitude et des éléments physiologiques, autres que la [Hb] : PV, RBCV, PaO<sub>2</sub>, FMD, viscosité sanguine... Ces éléments, associés à ceux issus des travaux de recherche récemment conduits par d'autres équipes,<sup>295</sup> pourraient

servir d'éléments de discussion à une mise à jour du consensus de 2005 définissant l'EE et le CMS.

Enfin, une redéfinition de la PAPH, tenant compte de l'évolution de la définition de l'hypertension pulmonaire,<sup>127</sup> avec des seuils éventuellement adaptés (au repos ou à l'effort), pour les patients présentant une EE ou un CMS,<sup>194</sup> semble également nécessaire. En ce sens, les données échographiques collectées à La Rinconada (publiées et non publiées),<sup>197</sup> au repos et à l'effort, pourraient permettre d'apporter des données utiles à cette redéfinition.

### **7.3 Homéostasie du fer en haute altitude : des questions en suspens**

L'étude 2 présentée dans ce travail de thèse, bien que conduite sur un effectif relativement faible d'habitants de haute altitude, a confirmé que les réserves en fer de ceux-ci étaient similaires à celles des habitants de plaine, malgré une demande érythropoïétique plus élevée. De plus, dans cette étude, l'homéostasie du fer était préservée, avec un équilibre similaire à celui des habitants de plaine, au moins chez les habitants de haute altitude sans CMS ou présentant un CMS léger.<sup>253</sup> L'observation dans cette population d'un état d'équilibre du métabolisme du fer, sans diminution des réserves en fer s'explique probablement par une augmentation lente et progressive de la demande en fer au cours des années de résidence en altitude, comme le sous-entend l'augmentation lente et progressive de l'Hct au cours du temps telle que nous l'avons observée dans l'étude 1.<sup>252</sup> Néanmoins, ces premiers résultats amènent plusieurs questionnements, pouvant constituer de futurs axes de recherche.

Premièrement, la constatation d'une activité érythropoïétique plus importante, chez les CMS les plus sévères, associée à une augmentation de l'ERFE et à une diminution de l'hepcidine, alors que ceux-ci présentent un RBCV et une  $Hb_{mass}$  relativement similaires aux habitants de haute altitude en bonne santé, amène à se poser la question d'un renouvellement plus élevé des globules rouges chez les CMS les plus sévères, en lien avec une durée de vie réduite de ceux-ci ou une destruction périphérique (hémolyse) plus importante. Ces hypothèses n'ont pas été explorées récemment à notre connaissance. Dans la seule étude, ancienne, s'étant intéressée à la mesure de la durée de vie des globules rouges des habitants de haute altitude

dans les Andes, les caractéristiques démographiques et hématologiques des participants n'étaient pas précisées.<sup>184</sup>

Deuxièmement, la préservation de réserves en fer relativement élevées chez ces habitants de haute altitude, pourrait constituer un bénéfice adaptatif, pouvant conférer, notamment, une forme de protection contre une augmentation trop importante de la pression artérielle pulmonaire, comme le suggère l'observation d'une élévation de celle-ci lors de l'induction d'une carence martiale chez des patients CMS.<sup>57</sup> Comme nous l'avons souligné en introduction, l'administration intraveineuse de fer, dans le but de moduler la vasoconstriction pulmonaire des patients CMS, n'a jamais été investiguée, alors que celle-ci a été testée, à la fois chez des Tibétains, et chez des Andéens, résidents de haute altitude en bonne santé.<sup>54,55</sup> Ainsi, la conduite d'une étude randomisée, visant à évaluer l'impact d'une administration intra-veineuse de fer chez des patients CMS sur la pression artérielle pulmonaire au repos et à l'effort, et potentiellement sur la capacité à l'exercice, pourrait constituer un axe de recherche intéressant. Dans un premier temps, un travail préliminaire pourrait être conduit, en recherchant une association statistique entre les paramètres du bilan martial et les données échographiques (au repos et à l'effort) précédemment recueillies à La Rinconada par notre équipe.<sup>197,253</sup>

Troisièmement, les observations et conclusions de cette étude 2 issues d'une population adulte et masculine ne sont probablement pas extrapolables à la population féminine de haute altitude (atteinte ou non de CMS) et aux enfants. Peu d'études se sont intéressées au statut martial et à l'évaluation des réserves en fer des habitantes de haute altitude,<sup>121,297</sup> et à notre connaissance, il n'existe pas d'études s'intéressant à l'évaluation de l'axe EPO-ERFE-hepcidine chez les femmes de haute altitude. Ainsi, la conduite de futures études spécifiques chez les femmes, visant à mesurer l'Hb<sub>mass</sub> et les volumes intravasculaires, ainsi qu'à investiguer le statut martial et l'axe EPO-ERFE-hepcidine est nécessaire. Chez l'enfant, le choix de seuils de [Hb] adaptés à l'altitude pour le diagnostic d'anémie, l'utilisation du seul diagnostic d'anémie comme indicateur d'une carence martiale, ainsi que l'intérêt potentiel d'une supplémentation martiale per os systématique en cas d'anémie sont des problématiques de santé publique majeures dans les populations pédiatriques andéennes de haute altitude, notamment au Pérou.<sup>247,298</sup> Ces thématiques de recherche seront prochainement abordées par notre équipe dans le cadre d'un projet de recherche commun avec l'équipe du Dr G. F. Gonzales (High Altitude Research Institute, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima).

#### 7.4 Hémostase et EE : des études complémentaires à mener

Contrairement à notre hypothèse de départ, nous n'avons pas observé dans l'étude 3, d'arguments biologiques en faveur d'un état d'hypercoagulabilité chez les habitants de haute altitude présentant une EE. Cependant, en l'absence d'une évaluation complémentaire de l'hémostase primaire et en l'absence de données épidémiologiques concernant le risque de survenue de thrombose veineuse et artérielle dans cette population, il paraît difficile de tirer des conclusions définitives sur l'impact potentiel de l'EE sur le système hémostatique. Ainsi, il reste notamment à conduire une évaluation qualitative de la fonction plaquettaire, dans cette population, par exemple en utilisant des tests d'évaluation délocalisés (ROTEM platelet<sup>®</sup>, PFA-100/200<sup>®</sup>...),<sup>299</sup> ce qui pourrait faire l'objet d'une étude complémentaire à l'étude 3 lors d'une future expédition scientifique à La Rinconada. Par ailleurs, la création d'un centre de santé et de recherche sur la haute altitude permanent à La Rinconada, pourra faciliter la conduite d'études épidémiologiques longitudinales afin d'évaluer le risque de survenue de thrombose veineuse et artérielle chez les habitants de haute altitude, souffrant ou non d'EE ou de CMS.

Enfin, il a récemment été suggéré qu'une augmentation de la synthèse de la transferrine induite par l'hypoxie, pouvait entraîner un état d'hypercoagulabilité en altitude, en interagissant avec la cascade de la coagulation, notamment en potentialisant l'activité de la thrombine et du facteur XIIa et en inhibant l'activité de l'antithrombine.<sup>300,301</sup> Dans cette étude mécanistique, humaine et animale, les échantillons de plasma humain utilisés provenaient d'habitants de haute altitude, résidant sur le plateau tibétain, à 3459 m.<sup>300</sup> Nous n'avons pas retrouvé, chez les habitants de haute altitude (souffrant ou non de CMS), dans l'étude 2, de taux plasmatiques de transferrine significativement plus élevés, en comparaison aux sujets contrôles de plaine.<sup>253</sup> Néanmoins, dans le cadre d'une prochaine étude s'intéressant à l'hémostase, il pourrait être intéressant de regarder s'il existe, dans la population andéenne de haute altitude, une relation entre le taux plasmatique de transferrine et l'activité des facteurs de la coagulation.

## 7.5 Évaluation des thérapeutiques sur le long terme et compréhension de leurs mécanismes sous-jacents

La survenue imprévisible de la pandémie de COVID-19 en 2020 a fortement perturbé la conduite de notre étude randomisée (étude 4), dont l'objectif initial était d'évaluer l'efficacité des traitements proposés (ACZ et atorvastatine) chez les patients atteints de CMS après une durée prolongée de traitement sur un critère de jugement principal simple et reproductible (Hct), mais également d'en étudier les effets sur les volumes intravasculaires et sur le système cardiovasculaire.

L'efficacité, déjà démontrée à plus basse altitude, de l'ACZ pour diminuer l'Hct et améliorer les symptômes du CMS,<sup>234-236</sup> a été montrée à court terme à La Rinconada dans l'étude 4.<sup>285</sup> La démonstration d'une efficacité persistante à plus long terme (c'est à dire après plusieurs mois ou années de traitement) de l'ACZ, ainsi que sa tolérance sur le long terme, restent à étudier dans le cadre d'études de phase IV, en vie réelle, dont la conduite à La Rinconada, sur un large effectif de participants, pourrait être facilitée par la construction future d'un centre de santé et de recherche permanent en collaboration avec les institutions administratives et médico-universitaires locales. De la même manière, l'effet à moyen et long terme de l'ACZ, et d'éventuelles autres molécules (incluant les statines, dont l'étude 4 n'a pas permis de mettre en évidence d'effet précoce, comme attendu) sur la fonction vasculaire, la qualité du sommeil, l'hypertension pulmonaire et le remodelage cardiaque doit faire l'objet d'études complémentaires.

Le rôle du PV dans la diminution de l'Hct ou de la [Hb] lors d'une intervention thérapeutique améliorant l'hématose, tel que mis en évidence dans le groupe traité par ACZ dans l'étude 4, reste à confirmer sur le plus long terme, et les mécanismes régulateurs sous-jacents régissant les volumes sanguins restent également à explorer.<sup>285</sup> De la même manière, les conséquences sur les volumes intravasculaires ou sur la fonction cardio-vasculaire d'une relocalisation au niveau de la mer de patients vivant en haute altitude et souffrant de CMS, ainsi que les mécanismes conduisant potentiellement à une réduction de l'Hb<sub>mass</sub> (néocytolyse, diminution de l'érythropoïèse) dans cette situation restent également à étudier dans des études rigoureusement menées (groupes contrôles, contrôle strict des facteurs confondants...).

## 8. Conclusion générale

Ce travail de thèse, conduit dans le cadre du projet de recherche Expédition 5300, a permis d'apporter des données épidémiologiques, physiologiques et thérapeutiques pouvant participer à l'amélioration de la compréhension et de la prise en charge du CMS, un syndrome clinico-biologique traduisant une maladaptation à la vie permanente en hypoxie en haute altitude. La poursuite de la conduite d'études cliniques (physiologiques et thérapeutiques), avec une méthodologie rigoureuse et reproductible, à différents niveaux d'altitude et sur des effectifs de patients suffisamment importants, semble nécessaire pour améliorer la compréhension des mécanismes conduisant au développement de l'EE et du CMS (comme nous l'avons développé dans les perspectives de ce travail) et pour améliorer la prise en charge thérapeutique de ces patients. La conduite d'études longitudinales, cruellement manquantes dans la littérature, paraît essentielle pour mieux définir l'implication des facteurs de risque temporels, au cours de la vie en haute altitude, dans l'apparition de l'EE et du CMS, mais aussi pour préciser l'évolution des systèmes respiratoires et cardio-vasculaires au cours du temps, ou évaluer la morbi-mortalité de cette maladaptation, ainsi que l'efficacité et la tolérance de thérapeutiques tel que l'ACZ sur le long terme. Un effort certain doit être mené afin que les futurs travaux réalisés dans ce contexte incluent également la population féminine, largement tenue à l'écart des travaux publiés jusqu'à ce jour. La réalisation de travaux de recherche d'ampleur est néanmoins limitée par un accès difficile à la population atteinte par le CMS, souvent isolée dans des zones à la géographie montagneuse et vivant dans des conditions socio-économiques souvent défavorisées. En ce sens, la construction de centres de recherche sur la haute altitude, incluant à la fois les acteurs locaux et des collaborations universitaires entre chercheurs locaux et spécialistes internationaux, comme celui en cours de construction à La Rinconada (5100-5300 m, Pérou), devrait aider à la conduite future de ces projets de recherche ambitieux.

Enfin, une meilleure compréhension des mécanismes d'adaptation et de maladaptation à vie permanente en haute altitude, en plus de présenter un intérêt direct pour au moins 80 millions d'habitants permanents de haute altitude, est également susceptible de présenter un intérêt dans la compréhension de l'impact sur l'organisme de l'hypoxie chronique à basse altitude, tel que subie au quotidien par de nombreux patients.

## 9. Références

1. Luks AM, Ainslie PN, Lawley JS, Roach RC, Simonson TS. Ward, Milledge and West's High Altitude Medicine and Physiology. 2021.
2. Richalet J-P, Herry J-P. Médecine de Montagne, Alpinisme et sports de montagne. 2017.
3. West JB. Prediction of barometric pressures at high altitudes with the use of model atmospheres. *J Appl Physiol* 1996;81(4):1850–1854.
4. West JB, Hackett PH, Maret KH, et al. Pulmonary gas exchange on the summit of Mount Everest. *J Appl Physiol* 1983;55(3):678–687.
5. Grocott MPW, Martin DS, Levett DZH, et al. Arterial Blood Gases and Oxygen Content in Climbers on Mount Everest. *New Engl J Medicine* 2009;360(2):140–149.
6. Tymko MM, Willie CK, Howe CA, et al. Acid-base balance at high altitude in lowlanders and indigenous highlanders. *J Appl Physiol* 2022;132(2):575–580.
7. B. WJ. Physiological Effects of Chronic Hypoxia. *New Engl J Med* 2017;376(20):1965–1971.
8. Storz JF, Scott GR. Life Ascending: Mechanism and Process in Physiological Adaptation to High-Altitude Hypoxia. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 2019;50(1):1–24.
9. Beall CM. Adaptation to High Altitude: Phenotypes and Genotypes. *Annu Rev Anthropol* 2014;43(1):251–272.
10. Moore LG. Measuring high-altitude adaptation. *J Appl Physiol* 2017;123(5):1371–1385.
11. Luks AM, Swenson ER, Bärtsch P. Acute high-altitude sickness. *European Respir Rev* 2017;26(143):160096.
12. Bärtsch P, Swenson ER. Acute High-Altitude Illnesses. *New Engl J Medicine* 2013;368(24):2294–2302.
13. Imray C, Booth A, Wright A, Bradwell A. Acute altitude illnesses. *BMJ* 2011;343:d4943–d4943.
14. Luks AM, Hackett PH. Medical Conditions and High-Altitude Travel. *New Engl J Med* 2022;386(4):364–373.
15. Parati G, Agostoni P, Basnyat B, et al. Clinical recommendations for high altitude exposure of individuals with pre-existing cardiovascular conditions A joint statement by the European Society of Cardiology, the Council on Hypertension of the European Society of Cardiology, the European Society of Hypertension, the International Society of Mountain

- Medicine, the Italian Society of Hypertension and the Italian Society of Mountain Medicine. *Eur Heart J* 2018;39(17):1546–1554.
16. Bärtsch P, Saltin B. General introduction to altitude adaptation and mountain sickness. *Scand J Med Sci Spor* 2008;18:1–10.
17. West JB. High Altitude Limits of Living Things. *High Alt Med Biol* 2021;22(3):342–345.
18. West JB. Highest inhabitants in the world. *Nature* 1986;324(6097):517–517.
19. West JB. Highest Permanent Human Habitation. *High Alt Med Biol* 2002;3(4):401–407.
20. Enserink M. Hypoxia city. *Science* 2019;365(6458):1098–1103.
21. Tremblay JC, Ainslie PN. Global and country-level estimates of human population at high altitude. *Proc National Acad Sci* 2021;118(18):e2102463118.
22. Burtcher M, Bachmann O, Hatzl T, et al. Cardiopulmonary and metabolic responses in healthy elderly humans during a 1-week hiking programme at high altitude. *Eur J Appl Physiol* 2001;84(5):379–386.
23. Wilson MH, Newman S, Imray CH. The cerebral effects of ascent to high altitudes. *Lancet Neurology* 2009;8(2):175–191.
24. Burtcher M, Gatterer H, Burtcher J, Mairböurl H. Extreme Terrestrial Environments: Life in Thermal Stress and Hypoxia. A Narrative Review. *Front Physiol* 2018;9:572.
25. Moore LG. Human Genetic Adaptation to High Altitude. *High Alt Med Biol* 2001;2(2):257–279.
26. Bärtsch P, Gibbs JSR. Effect of Altitude on the Heart and the Lungs. *Circulation* 2007;116(19):2191–2202.
27. Luks AM. Physiology in Medicine: A physiologic approach to prevention and treatment of acute high-altitude illnesses. *J Appl Physiol* 2015;118(5):509–519.
28. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2004;5(5):343–354.
29. Schödel J, Ratcliffe PJ. Mechanisms of hypoxia signalling: new implications for nephrology. *Nat Rev Nephrol* 2019;15(10):641–659.
30. Doutreleau S. Réponses physiologiques et pathologiques à l'altitude. *Rev Mal Respir* 2021;38(10):1013–1024.
31. Furian M, Tannheimer M, Burtcher M. Effects of Acute Exposure and Acclimatization to High-Altitude on Oxygen Saturation and Related Cardiorespiratory Fitness in Health and Disease. *J Clin Medicine* 2022;11(22):6699.
32. West JB. Lessons From Extreme Altitudes. *Front Physiol* 2019;10:703.

33. Cummins EP, Strowitzki MJ, Taylor CT. Mechanisms and Consequences of Oxygen and Carbon Dioxide Sensing in Mammals. *Physiol Rev* 2020;100(1):463–488.
34. Iturriaga R, Alcayaga J, Chapleau MW, Somers VK. Carotid body chemoreceptors: physiology, pathology, and implications for health and disease. *Physiol Rev* 2021;101(3):1177–1235.
35. Petersson J, Glenny RW. Gas exchange and ventilation–perfusion relationships in the lung. *Eur Respir J* 2014;44(4):1023–1041.
36. Wagner PD. The physiological basis of pulmonary gas exchange: implications for clinical interpretation of arterial blood gases. *Eur Respir J* 2015;45(1):227–243.
37. Tipton MJ, Harper A, Paton JFR, Costello JT. The human ventilatory response to stress: rate or depth? *J Physiology* 2017;595(17):5729–5752.
38. Teppema LJ, Dahan A. The Ventilatory Response to Hypoxia in Mammals: Mechanisms, Measurement, and Analysis. *Physiol Rev* 2010;90(2):675–754.
39. Lhuissier FJ, Canouï-Poitaine F, Richalet J. Ageing and cardiorespiratory response to hypoxia. *J Physiology* 2012;590(21):5461–5474.
40. Richalet J-P, Lhuissier F, Jean D. Ventilatory Response to Hypoxia and Tolerance to High Altitude in Women: Influence of Menstrual Cycle, Oral Contraception, and Menopause. *High Alt Med Biol* 2020;21(1):12–19.
41. Hoiland RL, Howe CA, Coombs GB, Ainslie PN. Ventilatory and cerebrovascular regulation and integration at high-altitude. *Clin Auton Res* 2018;28(4):423–435.
42. Richalet J-P, Larmignat P, Poitrine E, Letournel M, Canouï-Poitaine F. Physiological Risk Factors for Severe High-Altitude Illness. *Am J Resp Crit Care* 2012;185(2):192–198.
43. Puthon L, Bouzat P, Rupp T, Robach P, Favre-Juvin A, Verges S. Climbers in hypoxia. *Scand J Med Sci Spor* 2015;26(9):1052–1059.
44. Bernardi L, Schneider A, Pomidori L, Paolucci E, Cogo A. Hypoxic ventilatory response in successful extreme altitude climbers. *Eur Respir J* 2006;27(1):165–171.
45. Williams AM, Levine BD, Stemberge M. A change of heart: Mechanisms of cardiac adaptation to acute and chronic hypoxia. *J Physiology* 2022;600(18):4089–4104.
46. Mourot L. Limitation of Maximal Heart Rate in Hypoxia: Mechanisms and Clinical Importance. *Front Physiol* 2018;9:972.
47. Richalet J-P. Physiological and Clinical Implications of Adrenergic Pathways at High Altitude. *Adv Exp Med Biol* 2016;903:343–356.
48. Dunham-Snary KJ, Wu D, Sykes EA, et al. Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction From Molecular Mechanisms to Medicine. *Chest* 2017;151(1):181–192.

49. Wilkins MR, Ghofrani H-A, Weissmann N, Aldashev A, Zhao L. Pathophysiology and Treatment of High-Altitude Pulmonary Vascular Disease. *Circulation* 2015;131(6):582–590.
50. Riley CJ, Gavin M. Physiological Changes to the Cardiovascular System at High Altitude and Its Effects on Cardiovascular Disease. *High Alt Med Biol* 2017;18(2):102–113.
51. Richalet J-P, Gratadour P, Robach P, et al. Sildenafil Inhibits Altitude-induced Hypoxemia and Pulmonary Hypertension. *Am J Resp Crit Care* 2005;171(3):275–281.
52. Swenson ER. Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *High Alt Med Biol* 2013;14(2):101–110.
53. Bart NK, Curtis MK, Cheng H-Y, et al. Elevation of iron storage in humans attenuates the pulmonary vascular response to hypoxia. *J Appl Physiol* 2016;121(2):537–544.
54. Patrician A, Dawkins T, Coombs GB, et al. Global Research Expedition on Altitude-related Chronic Health 2018 Iron Infusion at High Altitude Reduces Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction Equally in Both Lowlanders and Healthy Andean Highlanders. *Chest* 2022;161(4):1022–1035.
55. Willie CK, Patrician A, Hoiland RL, et al. Influence of iron manipulation on hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary reactivity during ascent and acclimatization to 5050 m. *J Physiology* 2021;599(5):1685–1708.
56. Smith TG, Balanos GM, Croft QPP, et al. The increase in pulmonary arterial pressure caused by hypoxia depends on iron status. *J Physiology* 2008;586(24):5999–6005.
57. Smith TG, Talbot NP, Privat C, et al. Effects of Iron Supplementation and Depletion on Hypoxic Pulmonary Hypertension: Two Randomized Controlled Trials. *JAMA* 2009;302(13):1444–1450.
58. Frise MC, Robbins PA. Iron, oxygen, and the pulmonary circulation. *J Appl Physiol* 2015;119(12):1421–1431.
59. Hartmann JP, Bailey DM, Berg RMG. A song of iron and oxygen: Hypoxic pulmonary vasoconstriction and gas exchange in chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Physiol* 2023;
60. Siebenmann C, Robach P, Lundby C. Regulation of blood volume in lowlanders exposed to high altitude. *J Appl Physiol* 2017;123(4):957–966.
61. Mairbäurl H, Gassmann M, Muckenthaler MU. Geographical ancestry affects normal hemoglobin values in high-altitude residents. *J Appl Physiol* 2020;129(6):1451–1459.
62. Sawka MN, Convertino VA, Eichner ER, Schnieder SM, Young AJ. Blood volume: importance and adaptations to exercise training, environmental stresses, and trauma/sickness. *Medicine Sci Sports Exerc* 2000;32(2):332.

63. Beidleman BA, Staab JE, Muza SR, Sawka MN. Quantitative model of hematologic and plasma volume responses after ascent and acclimation to moderate to high altitudes. *Am J Physiology-regulatory Integr Comp Physiology* 2017;312(2):R265–R272.
64. Schlittler M, Gatterer H, Turner R, et al. Regulation of plasma volume in male lowlanders during 4 days of exposure to hypobaric hypoxia equivalent to 3500 m altitude. *J Physiology* 2020;599(4):1083–1096.
65. Roche J, Rasmussen P, Gatterer H, et al. Hypoxia briefly increases diuresis but reduces plasma volume by fluid redistribution in women. *Am J Physiol-heart C* 2022;323(6):H1068–H1079.
66. Siebenmann C, Cathomen A, Hug M, et al. Hemoglobin mass and intravascular volume kinetics during and after exposure to 3,454-m altitude. *J Appl Physiol* 2015;119(10):1194–1201.
67. Rasmussen P, Siebenmann C, Diaz V, Lundby C. Red Cell Volume Expansion at Altitude. *Medicine Sci Sports Exerc* 2013;45(9):1767–1772.
68. Mairbäurl H. Neocytolysis: How to Get Rid of the Extra Erythrocytes Formed by Stress Erythropoiesis Upon Descent From High Altitude. *Front Physiol* 2018;9:345.
69. Klein M, Kaestner L, Bogdanova AY, et al. Absence of neocytolysis in humans returning from a 3-week high-altitude sojourn. *Acta Physiol* 2021;232(3):e13647.
70. Rice L, Gunga H. Neocytolysis on descending the mountain and ascending into space. *Acta Physiol* 2021;232(3):e13676.
71. Guglielmo A, Angela R. The debate on neocytolysis. *Acta Physiol* 2022;234(2):e13723.
72. Recktenwald SM, Kaestner L, Bogdanova AY, Minetti G, Klein M, Mairbäurl H. “So is science ...”1: No evidence for neocytolysis on descending the mountains (Response to Rice and Gunga). *Acta Physiol* 2021;233(3):e13709.
73. Palubiski LM, O’Halloran KD, O’Neill J. Renal Physiological Adaptation to High Altitude: A Systematic Review. *Front Physiol* 2020;11:756.
74. Goldfarb-Rumyantzev AS, Alper SL. Short-term responses of the kidney to high altitude in mountain climbers. *Nephrol Dial Transpl* 2014;29(3):497–506.
75. Steele AR, Ainslie PN, Stone R, et al. Global REACH 2018: Characterizing Acid–Base Balance Over 21 Days at 4,300 m in Lowlanders. *High Alt Med Biol* 2022;23(2):185–191.
76. Lundby C, Calbet JAL, Hall G van, Saltin B, Sander M. Pulmonary gas exchange at maximal exercise in Danish lowlanders during 8 wk of acclimatization to 4,100 m and in high-altitude Aymara natives. *Am J Physiology-regulatory Integr Comp Physiology* 2004;287(5):R1202–R1208.

77. Wagner PD, Araoz M, Boushel R, et al. Pulmonary gas exchange and acid-base state at 5,260 m in high-altitude Bolivians and acclimatized lowlanders. *J Appl Physiol* 2002;92(4):1393–1400.
78. Gatterer H, Wille M, Faulhaber M, et al. Association between Body Water Status and Acute Mountain Sickness. *Plos One* 2013;8(8):e73185.
79. Loeppky JA, Icenogle MV, Maes D, Riboni K, Hinghofer-Szalkay H, Roach RC. Early fluid retention and severe acute mountain sickness. *J Appl Physiol* 2005;98(2):591–597.
80. Goetze O, Schmitt J, Spliethoff K, et al. Adaptation of iron transport and metabolism to acute high-altitude hypoxia in mountaineers. *Hepatology* 2013;58(6):2153–2162.
81. Piperno A, Galimberti S, Mariani R, et al. Modulation of hepcidin production during hypoxia-induced erythropoiesis in humans in vivo: data from the HIGHCARE project. *Blood* 2011;117(10):2953–2959.
82. Muckenthaler MU, Mairbäurl H, Gassmann M. Iron metabolism in high-altitude residents. *J Appl Physiol* 2020;129(4):920–925.
83. Gassmann M, Muckenthaler MU. Adaptation of iron requirement to hypoxic conditions at high altitude. *J Appl Physiol* 2015;119(12):1432–1440.
84. Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, Galy B. A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell* 2017;168(3):344–361.
85. Vallet N, Fer C du GR et du. Rôle de l'érythroferrone dans le métabolisme du fer : des résultats expérimentaux aux modèles physiopathologiques. *La Revue De Médecine Interne* 2018;39(3):178–184.
86. Talbot NP, Lakhali S, Smith TG, et al. Regulation of hepcidin expression at high altitude. *Blood* 2012;119(3):857–860.
87. Emrich IE, Scheuer A, Wagenpfeil S, Ganz T, Heine GH. Increase of plasma erythroferrone levels during high-altitude exposure: A sub-analysis of the TOP OF HOME study. *Am J Hematol* 2021;96(5):E179–E181.
88. Robach P, Gammella E, Recalcati S, et al. Induction of erythroferrone in healthy humans by micro-dose recombinant erythropoietin or high-altitude exposure. *Haematologica* 2020;106(2):haematol.2019.233874.
89. Montgomery AB, Mills J, Luce JM. Incidence of Acute Mountain Sickness at Intermediate Altitude. *JAMA* 1989;261(5):732–734.
90. Gabry AL, Ledoux X, Mozziconacci M, Martin C. High-Altitude Pulmonary Edema at Moderate Altitude (< 2,400 m; 7,870 feet) A Series of 52 Patients. *Chest* 2003;123(1):49–53.
91. West JB. High-Altitude Medicine. *Am J Resp Crit Care* 2012;186(12):1229–1237.

92. Smedley T, Grocott MP. Acute high-altitude illness: a clinically orientated review. *Br J Pain* 2013;7(2):85–94.
93. Hackett PH, Roach RC. High-Altitude Illness. *New Engl J Medicine* 2001;345(2):107–114.
94. Berendsen RR, Bärtsch P, Basnyat B, et al. Strengthening Altitude Knowledge: A Delphi Study to Define Minimum Knowledge of Altitude Illness for Laypersons Traveling to High Altitude. *High Alt Med Biol* 2022;23(4):330–337.
95. Alarcón RF, Huayanay R, Monge E. Poor Knowledge of Acute Mountain Sickness in Latin American Medical Students. *Wild Environ Med* 2022;33(2):148–153.
96. Richalet J-P, Lhuissier F-J, Larmignat P, Canouï-Poitaine F. Évaluation de la tolérance à l'hypoxie et susceptibilité aux pathologies de haute altitude. *Sci Sport* 2015;30(6):355–363.
97. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia* 2018;38(1):1–211.
98. Maeder MB, Brugger H, Pun M, et al. The STAR Data Reporting Guidelines for Clinical High Altitude Research. *High Alt Med Biol* 2018;19(1):7–14.
99. Meier D, Collet T-H, Locatelli I, et al. Does This Patient Have Acute Mountain Sickness?: The Rational Clinical Examination Systematic Review. *JAMA* 2017;318(18):1810–1819.
100. Roach RC, Hackett PH, Oelz O, et al. The 2018 Lake Louise Acute Mountain Sickness Score. *High Alt Med Biol* 2018;19(1):4–6.
101. Nespoulet H, Wuyam B, Tamisier R, et al. Altitude illness is related to low hypoxic chemoresponse and low oxygenation during sleep. *Eur Respir J* 2012;40(3):673–680.
102. Berger MM, Sareban M, Bärtsch P. Acute mountain sickness: Do different time courses point to different pathophysiological mechanisms? *J Appl Physiol* 2020;128(4):952–959.
103. Turner REF, Gatterer H, Falla M, Lawley JS. High-altitude cerebral edema: its own entity or end-stage acute mountain sickness? *J Appl Physiol* 2021;131(1):313–325.
104. Luks AM, Auerbach PS, Freer L, et al. Wilderness Medical Society Practice Guidelines for the Prevention and Treatment of Acute Altitude Illness: 2019 Update. *Wild Environ Med* 2019;30(4):S3–S18.
105. Toussaint CM, Kenefick RW, Petrassi FA, Muza SR, Charkoudian N. Altitude, Acute Mountain Sickness, and Acetazolamide: Recommendations for Rapid Ascent. *High Alt Med Biol* 2021;22(1):5–13.
106. Schmickl CN, Owens RL, Orr JE, Edwards BA, Malhotra A. Side effects of acetazolamide: a systematic review and meta-analysis assessing overall risk and dose dependence. *Bmj Open Respir Res* 2020;7(1):e000557.

107. Swenson ER. Pharmacology of acute mountain sickness: old drugs and newer thinking. *J Appl Physiol* 2016;120(2):204–215.
108. Hackett PH, Rennie D, Grover RF, Reeves JT. Acute mountain sickness and the edemas of high altitude: A common pathogenesis? *Resp Physiol* 1981;46(3):383–390.
109. Swenson ER, Bärtsch P. High-Altitude Pulmonary Edema. *Compr Physiol* 2013;2(4):2753–2773.
110. West J, Mathieu-Costello O. High Altitude Pulmonary Edema is Caused by Stress Failure of Pulmonary Capillaries. *Int J Sports Med* 1992;13(S 1):S54–S58.
111. Allemann Y, Hutter D, Lipp E, et al. Patent Foramen Ovale and High-Altitude Pulmonary Edema. *JAMA* 2006;296(24):2954–2958.
112. Tymko MM, Tremblay JC, Bailey DM, Green DJ, Ainslie PN. The impact of hypoxaemia on vascular function in lowlanders and high altitude indigenous populations. *J Physiology* 2019;597(24):5759–5776.
113. Beall CM, Decker MJ, Brittenham GM, Kushner I, Gebremedhin A, Strohl KP. An Ethiopian pattern of human adaptation to high-altitude hypoxia. *Proc National Acad Sci* 2002;99(26):17215–17218.
114. Beall CM. Two routes to functional adaptation: Tibetan and Andean high-altitude natives. *Proc National Acad Sci* 2007;104(suppl\_1):8655–8660.
115. Beall CM. Andean, Tibetan, and Ethiopian patterns of adaptation to high-altitude hypoxia. *Integr Comp Biol* 2006;46(1):18–24.
116. Gilbert-Kawai ET, Milledge JS, Grocott MPW, Martin DS. King of the Mountains: Tibetan and Sherpa Physiological Adaptations for Life at High Altitude. *Physiology* 2014;29(6):388–402.
117. Bhandari S, Cavalleri GL. Population History and Altitude-Related Adaptation in the Sherpa. *Front Physiol* 2019;10:1116.
118. Gassmann M, Mairbäurl H, Livshits L, et al. The increase in hemoglobin concentration with altitude varies among human populations. *Ann Ny Acad Sci* 2019;1450(1):204–220.
119. Simonson TS, Wei G, Wagner HE, et al. Low haemoglobin concentration in Tibetan males is associated with greater high-altitude exercise capacity. *J Physiology* 2015;593(14):3207–3218.
120. Stembridge M, Williams AM, Gasho C, et al. The overlooked significance of plasma volume for successful adaptation to high altitude in Sherpa and Andean natives. *Proc National Acad Sci* 2019;116(33):16177–16179.
121. Lundgrin EL, Janocha AJ, Koch CD, et al. Plasma hepcidin of Ethiopian highlanders with steady-state hypoxia. *Blood* 2013;122(11):1989–1991.

122. Stembridge M, Ainslie PN, Shave R. Short-term adaptation and chronic cardiac remodelling to high altitude in lowlander natives and Himalayan Sherpa. *Exp Physiol* 2015;100(11):1242–1246.
123. Groves BM, Droma T, Sutton JR, et al. Minimal hypoxic pulmonary hypertension in normal Tibetans at 3,658 m. *J Appl Physiol* 1993;74(1):312–318.
124. Penaloza D, Arias-Stella J. The Heart and Pulmonary Circulation at High Altitudes. *Circulation* 2007;115(9):1132–1146.
125. Xu X-Q, Jing Z-C. High-altitude pulmonary hypertension. *European Respir Rev* 2009;18(111):13–17.
126. León-Velarde F, Maggiorini M, Reeves JT, et al. Consensus Statement on Chronic and Subacute High Altitude Diseases. *High Alt Med Biol* 2005;6(2):147–157.
127. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2019;53(1):1801913.
128. Soria R, Egger M, Scherrer U, Bender N, Rimoldi SF. Pulmonary artery pressure and arterial oxygen saturation in people living at high or low altitude: systematic review and meta-analysis. *J Appl Physiol* 2016;121(5):1151–1159.
129. Horscroft JA, Kotwica AO, Laner V, et al. Metabolic basis to Sherpa altitude adaptation. *Proc National Acad Sci* 2017;114(24):6382–6387.
130. Azad P, Stobdan T, Zhou D, et al. High-altitude adaptation in humans: from genomics to integrative physiology. *J Mol Med* 2017;95(12):1269–1282.
131. Simonson TS. Altitude Adaptation: A Glimpse Through Various Lenses. *High Alt Med Biol* 2015;16(2):125–137.
132. Song D, Navalsky BE, Guan W, et al. Tibetan PHD2, an allele with loss-of-function properties. *Proc National Acad Sci* 2020;117(22):12230–12238.
133. Julian CG, Moore LG. Human Genetic Adaptation to High Altitude: Evidence from the Andes. *Genes* 2019;10(2):150.
134. Julian CG. Epigenomics and human adaptation to high altitude. *J Appl Physiol* 2017;123(5):1362–1370.
135. León-Velarde F, McCullough RG, McCullough RE, Reeves JT, Group CCW. Proposal for Scoring Severity in Chronic Mountain Sickness (Cms). *Adv Exp Med Biol* 2003;543:339–354.
136. Monge C. La enfermedad de los Andes (Síndromes eritrémicos). *Anales De La Fac De Medicina* 1928;14(0):1–314.
137. Villafuerte FC, Corante N. Chronic Mountain Sickness: Clinical Aspects, Etiology, Management, and Treatment. *High Alt Med Biol* 2016;17(2):61–69.

138. Hurtado A. Chronic Mountain Sickness. *JAMA* 1942;120(16):1278–1282.
139. Monge C. Life in the Andes and Chronic Mountain Sickness. *Science* 1942;95(2456):79–84.
140. Monge C. Chronic Mountain Sickness. *Physiol Rev* 1943;23(2):166–184.
141. Peñaloza D, Sime F. Chronic cor pulmonale due to loss of altitude acclimatization (chronic mountain sickness). *Am J Medicine* 1971;50(6):728–743.
142. Arias-Stella J, Krüger H, Recavarren S. Pathology of chronic mountain sickness. *Thorax* 1973;28(6):701.
143. León-Velarde F, Richalet J-P. Respiratory Control in Residents at High Altitude: Physiology and Pathophysiology. *High Alt Med Biol* 2006;7(2):125–137.
144. Monge C, León-Velarde F, Arregui A. Increasing Prevalence of Excessive Erythrocytosis with Age among Healthy High-Altitude Miners. *New Engl J Medicine* 1989;321(18):1271–1272.
145. Monge C, Arregui A, León-Velarde F. Pathophysiology and Epidemiology of Chronic Mountain Sickness. *Int J Sports Med* 1992;13(S 1):S79–S81.
146. Villafuerte FC, Simonson TS, Bermudez D, León-Velarde F. High-Altitude Erythrocytosis: Mechanisms of Adaptive and Maladaptive Responses. *Physiology* 2022;37(4):175–186.
147. Jefferson JA, Escudero E, Hurtado M-E, et al. Excessive erythrocytosis, chronic mountain sickness, and serum cobalt levels. *Lancet* 2002;359(9304):407–408.
148. Arregui A, León-Velarde F, Cabrera J, Paredes S, Vizcarra D, Umeres H. Migraine, Polycythemia and Chronic Mountain Sickness. *Cephalalgia* 2020;14(5):339–341.
149. Dumas G, Merceron S, Zafrani L, et al. Syndrome d’hyperviscosité plasmatique. *La Revue De Médecine Interne* 2015;36(9):588–595.
150. Tremblay JC, Hoiland RL, Howe CA, et al. Global REACH 2018: High Blood Viscosity and Hemoglobin Concentration Contribute to Reduced Flow-Mediated Dilation in High-Altitude Excessive Erythrocytosis. *Hypertension* 2019;73(6):1327–1335.
151. Stauffer E, Loyrion E, Hanco I, et al. Blood viscosity and its determinants in the highest city in the world. *J Physiology* 2020;598(18):4121–4130.
152. León-Velarde F, Gamboa A, Rivera-Ch M, Palacios J-A, Robbins PA. Selected Contribution: Peripheral chemoreflex function in high-altitude natives and patients with chronic mountain sickness. *J Appl Physiol* 2003;94(3):1269–1278.
153. Fatemian M, Gamboa A, León-Velarde F, Rivera-Ch M, Palacios J-A, Robbins PA. Selected Contribution: Ventilatory response to CO<sub>2</sub> in high-altitude natives and patients with chronic mountain sickness. *J Appl Physiol* 2003;94(3):1279–1287.

154. Perger E, Baillieux S, Esteve F, et al. Nocturnal hypoxemia, blood pressure, vascular status and chronic mountain sickness in the highest city in the world. *Ann Med* 2022;54(1):1884–1893.
155. Ferrari AD, Miranda JJ, Gilman RH, et al. Prevalence, Clinical Profile, Iron Status, and Subject-Specific Traits for Excessive Erythrocytosis in Andean Adults Living Permanently at 3,825 Meters Above Sea Level. *Chest* 2014;146(5):1327–1336.
156. Heinrich EC, Orr JE, Gilbertson D, et al. Relationships Between Chemoreflex Responses, Sleep Quality, and Hematocrit in Andean Men and Women. *Front Physiol* 2020;11:437.
157. Rexhaj E, Rimoldi SF, Pratali L, et al. Sleep-Disordered Breathing and Vascular Function in Patients With Chronic Mountain Sickness and Healthy High-Altitude Dwellers. *Chest* 2016;149(4):991–998.
158. Julian CG, Vargas E, Gonzales M, et al. Sleep-disordered breathing and oxidative stress in preclinical chronic mountain sickness (excessive erythrocytosis). *Resp Physiol Neurobiol* 2013;186(2):188–196.
159. Spicuzza L, Casiraghi N, Gamboa A, et al. Sleep-related hypoxaemia and excessive erythrocytosis in Andean high-altitude natives. *Eur Respir J* 2004;23(1):41–46.
160. Moore LG, Niermeyer S, Vargas E. Does chronic mountain sickness (CMS) have perinatal origins? *Resp Physiol Neurobiol* 2007;158(2–3):180–189.
161. Julian CG, Gonzales M, Rodriguez A, et al. Perinatal hypoxia increases susceptibility to high-altitude polycythemia and attendant pulmonary vascular dysfunction. *Am J Physiol-heart C* 2015;309(4):H565–H573.
162. Villafuerte FC, Macarlupú JL, Anza-Ramírez C, et al. Decreased plasma soluble erythropoietin receptor in high-altitude excessive erythrocytosis and Chronic Mountain Sickness. *J Appl Physiol* 2014;117(11):1356–1362.
163. Villafuerte FC, Corante N, Anza-Ramírez C, et al. Plasma soluble erythropoietin receptor is decreased during sleep in Andean highlanders with Chronic Mountain Sickness. *J Appl Physiol* 2016;121(1):53–58.
164. Villafuerte FC. New genetic and physiological factors for excessive erythrocytosis and Chronic Mountain Sickness. *J Appl Physiol* 2015;119(12):1481–1486.
165. Cole AM, Petousi N, Cavalleri GL, Robbins PA. Genetic Variation in SENP1 and ANP32D as Predictors of Chronic Mountain Sickness. *High Alt Med Biol* 2014;15(4):497–499.
166. Zhou D, Udpa N, Ronen R, et al. Whole-Genome Sequencing Uncovers the Genetic Basis of Chronic Mountain Sickness in Andean Highlanders. *Am J Hum Genetics* 2013;93(3):452–462.

167. Bermudez D, Azad P, Figueroa-Mujica R, et al. Increased hypoxic proliferative response and gene expression in erythroid progenitor cells of Andean highlanders with chronic mountain sickness. *Am J Physiology-regulatory Integr Comp Physiology* 2020;318(1):R49–R56.
168. Azad P, Zhao HW, Cabrales PJ, et al. Senp1 drives hypoxia-induced polycythemia via GATA1 and Bcl-xL in subjects with Monge's disease. *J Exp Med* 2016;213(12):2729–2744.
169. León-Velarde F, Rivera-Chira M, Tapia R, Huicho L, Monge-C C. Relationship of ovarian hormones to hypoxemia in women residents of 4,300 m. *Am J Physiology-regulatory Integr Comp Physiology* 2001;280(2):R488–R493.
170. Azad P, Villafuerte FC, Bermudez D, Patel G, Haddad GG. Protective role of estrogen against excessive erythrocytosis in Monge's disease. *Exp Mol Medicine* 2021;53(1):125–135.
171. Sahota IS, Panwar NS. Prevalence of Chronic Mountain Sickness in high altitude districts of Himachal Pradesh. *Indian J Occup Environ Medicine* 2013;17(3):94–100.
172. Jiang C, Chen J, Liu F, et al. Chronic mountain sickness in Chinese Han males who migrated to the Qinghai-Tibetan plateau: application and evaluation of diagnostic criteria for chronic mountain sickness. *BMC Public Health* 2014;14(1):701.
173. Wu T. Chronic mountain sickness on the Qinghai-Tibetan plateau. *Chinese Med J* 2005;118(2):161–8.
174. Appenzeller O, Claydon VE, Gulli G, et al. Cerebral Vasodilatation to Exogenous NO Is a Measure of Fitness for Life at Altitude. *Stroke* 2006;37(7):1754–1758.
175. Hanco I, Bailly S, Baillieux S, et al. Excessive Erythrocytosis and Chronic Mountain Sickness in Dwellers of the Highest City in the World. *Front Physiol* 2020;11:773.
176. Sime F, Monge C, Whittombury J. Age as a cause of chronic mountain sickness (Monge's disease). *Int J Biometeorol* 1975;19(2):93–98.
177. León-Velarde F, Arregui A, Monge C, Ruiz HR y. Aging at high altitudes and the risk of chronic mountain sickness. *J Wilderness Med* 1993;4(2):183–188.
178. Whittombury J, Monge CC. High Altitude, Haematocrit and Age. *Nature* 1972;238(5362):278–279.
179. Hurtado A. Some clinical aspects of Life at high altitudes. *Ann Intern Med* 1960;53(2):247.
180. Merino CF. Studies on blood formation and destruction in the polycythemia of high altitude. *Blood* 1950;5(1):1–31.
181. Lawrence JH, Huff RL, Siri W, Wasserman LR, Hennessy TG. A Physiological Study in the Peruvian Andes. *Acta Med Scand* 1952;142(2):117–131.

182. Sánchez C, Merino C, Figallo M. Simultaneous measurement of plasma volume and cell mass in polycythemia of high altitude. *J Appl Physiol* 1970;28(6):775–778.
183. Reynafarje C, Lozano R, Valdiviesco J. The polycythemia of high altitudes: iron metabolism and related aspects. *Blood* 1959;14(4):433–55.
184. Berlin NI, Reynafarje C, Lawrence JH. Red Cell Life Span in the Polycythemia of High Altitude. *J Appl Physiol* 1954;7(3):271–272.
185. Claydon VE, Norcliffe LJ, Moore JP, et al. Orthostatic tolerance and blood volumes in Andean high altitude dwellers. *Exp Physiol* 2004;89(5):565–571.
186. Schmidt WFJ, Wachsmuth N, Jimenez J, Soria R. Hemoglobin Mass and Blood Volume in Patients With Altitude-Related Polycythemia. *Front Physiol* 2022;13:867108.
187. Steele AR, Tymko MM, Meah VL, et al. Global REACH 2018: volume regulation in high-altitude Andeans with and without chronic mountain sickness. *Am J Physiology-regulatory Integr Comp Physiology* 2021;321(3):R504–R512.
188. Oberholzer L, Lundby C, Stauffer E, et al. Reevaluation of excessive erythrocytosis in diagnosing chronic mountain sickness in men from the world’s highest city. *Blood* 2020;136(16):1884–1888.
189. Wang Y, Huang X, Yang W, Zeng Q. Platelets and High-Altitude Exposure: A Meta-Analysis. *High Alt Med Biol* 2022;23(1):43–56.
190. Wang Z, Tenzing N, Xu Q, et al. Apoptosis is one cause of thrombocytopenia in patients with high-altitude polycythemia. *Platelets* 2023;34(1):2157381.
191. Talbot NP, Smith TG, Lakhali-Littleton S, et al. Suppression of plasma hepcidin by venesection during steady-state hypoxia. *Blood* 2016;127(9):1206–1207.
192. Pratali L, Allemann Y, Rimoldi SF, et al. RV Contractility and Exercise-Induced Pulmonary Hypertension in Chronic Mountain Sickness A Stress Echocardiographic and Tissue Doppler Imaging Study. *Jacc Cardiovasc Imaging* 2013;6(12):1287–1297.
193. Maignan M, Rivera-Ch M, Privat C, Leòn-Velarde F, Richalet J-P, Pham I. Pulmonary Pressure and Cardiac Function in Chronic Mountain Sickness Patients. *Chest* 2009;135(2):499–504.
194. Soria R, Egger M, Scherrer U, Bender N, Rimoldi SF. Pulmonary arterial pressure at rest and during exercise in chronic mountain sickness: a meta-analysis. *Eur Respir J* 2019;53(6):1802040.
195. Stuber T, Sartori C, Schwab M, et al. Exaggerated Pulmonary Hypertension During Mild Exercise in Chronic Mountain Sickness. *Chest* 2010;137(2):388–392.
196. Naeije R, Vanderpool R. Pulmonary Hypertension and Chronic Mountain Sickness. *High Alt Med Biol* 2013;14(2):117–125.

197. Doutreleau S, Ulliel-Roche M, Hanco I, et al. Cardiac remodelling in the highest city in the world: effects of altitude and chronic mountain sickness. *Eur J Prev Cardiol* 2022;29(17):2154–2162.
198. Rimoldi SF, Rexhaj E, Pratali L, et al. Systemic Vascular Dysfunction in Patients With Chronic Mountain Sickness. *Chest* 2012;141(1):139–146.
199. Bailey DM, Rimoldi SF, Rexhaj E, et al. Oxidative-Nitrosative Stress and Systemic Vascular Function in Highlanders With and Without Exaggerated Hypoxemia. *Chest* 2013;143(2):444–451.
200. Thijssen DHJ, Bruno RM, Mil ACCM van, et al. Expert consensus and evidence-based recommendations for the assessment of flow-mediated dilation in humans. *Eur Heart J* 2019;40(30):2534–2547.
201. Corante N, Anza-Ramírez C, Figueroa-Mujica R, et al. Excessive Erythrocytosis and Cardiovascular Risk in Andean Highlanders. *High Alt Med Biol* 2018;19(3):221–231.
202. Okumiya K, Fukutomi E, Kimura Y, et al. Strong Association Between Polycythemia and Glucose Intolerance in Older Adults Living at High Altitudes in the Andes. *J Am Geriatr Soc* 2011;59(10):1971–1973.
203. Bilo G, Acone L, Anza-Ramírez C, et al. Office and Ambulatory Arterial Hypertension in Highlanders. *Hypertension* 2020;76(6):1962–1970.
204. Manier G, Guenard H, Castaing Y, Varene N, Vargas E. Pulmonary gas exchange in Andean natives with excessive polycythemia--effect of hemodilution. *J Appl Physiol* 1988;65(5):2107–2117.
205. Cruz JC, Diaz C, Marticorena E, Hilario V. Phlebotomy improves Pulmonary Gas Exchange in Chronic Mountain Polycythemia. *Respiration* 1979;38(6):305–313.
206. Lozano R, C. CM. Renal function in high-altitude natives and in natives with chronic mountain sickness. *J Appl Physiol* 1965;20(5):1026–1027.
207. Arestegui AH, Fuquay R, Sirota J, et al. High Altitude Renal Syndrome (HARS). *J Am Soc Nephrol* 2011;22(11):1963–1968.
208. Jefferson JA, Escudero E, Hurtado M-E, et al. Hyperuricemia, hypertension, and proteinuria associated with high-altitude polycythemia. *Am J Kidney Dis* 2002;39(6):1135–1142.
209. Wang H, Tang C, Dang Z, et al. Clinicopathological characteristics of high-altitude polycythemia-related kidney disease in Tibetan inhabitants. *Kidney Int* 2022;102(1):196–206.
210. Bailey DM, Brugniaux JV, Filipponi T, et al. Exaggerated systemic oxidative-inflammatory-nitrosative stress in chronic mountain sickness is associated with cognitive decline and depression. *J Physiology* 2019;597(2):611–629.

211. Shanjun Z, Shenwei X, Bin X, Huaijun T, Simin Z, Peng L. Individual chronic mountain sickness symptom is an early warning sign of cognitive impairment. *Physiol Behav* 2020;214:112748.
212. Bao H, He X, Wang F, Kang D. Study of Brain Structure and Function in Chronic Mountain Sickness Based on fMRI. *Front Neurol* 2022;12:763835.
213. Bao H, Li R, He M, Kang D, Zhao L. DTI Study on Brain Structure and Cognitive Function in Patients with Chronic Mountain Sickness. *Sci Rep* 2019;9(1):19334.
214. Bao H, Wang D, Zhao X, et al. Cerebral Edema in Chronic Mountain Sickness: a New Finding. *Sci Rep* 2017;7(1):1–8.
215. Treml B, Wallner B, Blank C, Fries D, Schobersberger W. The Influence of Environmental Hypoxia on Hemostasis—A Systematic Review. *Frontiers Cardiovasc Medicine* 2022;9:813550.
216. Byrnes JR, Wolberg AS. Red blood cells in thrombosis. *Blood* 2017;130(16):1795–1799.
217. Ortiz-Prado E, Cordovez SP, Vasconez E, Viscor G, Roderick P. Chronic high-altitude exposure and the epidemiology of ischaemic stroke: a systematic review. *Bmj Open* 2022;12(4):e051777.
218. DeSouza NM, Brewster LM, Bain AR, et al. Global REACH 2018: Influence of excessive erythrocytosis on coagulation and fibrinolytic factors in Andean highlanders. *Exp Physiol* 2021;106(6):1335–1342.
219. Hanco I, Champigneulle B, Stauffer E, et al. Hemostasis in highlanders with excessive erythrocytosis at 5100 m: Preliminary data from the highest city of the world. *Resp Physiol Neurobiol* 2020;282:103535.
220. Volod O, Bunch CM, Zackariya N, et al. Viscoelastic Hemostatic Assays: A Primer on Legacy and New Generation Devices. *J Clin Medicine* 2022;11(3):860.
221. Groepenhoff H, Overbeek MJ, Mulè M, et al. Exercise Pathophysiology in Patients With Chronic Mountain Sickness. *Chest* 2012;142(4):877–884.
222. Hansen AB, Morales G, Amin SB, et al. Global REACH 2018: the adaptive phenotype to life with chronic mountain sickness and polycythaemia. *J Physiology* 2021;599(17):4021–4044.
223. Anza-Ramírez C, Gu W, Macarlupú JL, et al. Preserved peak exercise capacity in Andean highlanders with excessive erythrocytosis both before and after isovolumic hemodilution. *J Appl Physiol* 2023;134(1):36–49.
224. Sime F, Peñaloza D, Ruiz L. Bradycardia, increased cardiac output, and reversal of pulmonary hypertension in altitude natives living at sea level. *Brit Heart J* 1971;33(5):647.
225. Rice L, Ruiz W, Driscoll T, et al. Neocytolysis on Descent from Altitude: A Newly Recognized Mechanism for the Control of Red Cell Mass. *Ann Intern Med* 2001;134(8):652.

226. Rivera-Ch M, León-Velarde F, Huicho L. Treatment of chronic mountain sickness: Critical reappraisal of an old problem. *Resp Physiol Neurobiol* 2007;158(2–3):251–265.
227. Winslow RM, Monge CC, Brown EG, et al. Effects of hemodilution on O<sub>2</sub> transport in high-altitude polycythemia. *J Appl Physiol* 1985;59(5):1495–1502.
228. Niu M, Singh S, Mi M, et al. Safety and Efficacy of Therapeutic Erythrocytapheresis Treatment in Chronic Mountain Sickness Patients in Shigatse, Tibet, China. *Med Sci Monitor* 2020;26:e927853-1-e927853-7.
229. Dong Y, Dun B, Dui PBW, et al. Therapeutic Erythrocytapheresis Is Effective in Treating High Altitude Polycythemia on the Qinghai-Tibet Plateau. *Wild Environ Med* 2020;31(4):426–430.
230. Macarlupú JL, Vizcardo-Galindo G, Figueroa-Mujíca R, Voituron N, Richalet J, Villafuerte FC. Sub-maximal aerobic exercise training reduces haematocrit and ameliorates symptoms in Andean highlanders with chronic mountain sickness. *Exp Physiol* 2021;106(11):2198–2209.
231. Kryger M, McCullough RE, Collins D, Scoggin CH, Weil JV, Grover RF. Treatment of Excessive Polycythemia of High Altitude with Respiratory Stimulant Drugs. *Am Rev Respir Dis* 1978;117(3):455–64.
232. Villena M, Vargas E, Guénard H, Nallar N, Tellez W, Spielvogel H. [Double-blind study on the action of almitrine in patients with polycythemia of high altitude]. *Bulletin Europeen De Physiopathologie Respir* 1985;21(2):165–70.
233. Plata R, Cornejo A, Arratia C, et al. Angiotensin-converting-enzyme inhibition therapy in altitude polycythaemia: a prospective randomised trial. *Lancet* 2002;359(9307):663–666.
234. Richalet J-P, Rivera M, Bouchet P, et al. Acetazolamide : A Treatment for Chronic Mountain Sickness. *Am J Resp Crit Care* 2005;172(11):1427–1433.
235. Richalet J-P, Rivera-Ch M, Maignan M, et al. Acetazolamide for Monge’s Disease. *Am J Resp Crit Care* 2008;177(12):1370–1376.
236. Sharma S, Gralla J, Ordonez JG, et al. Acetazolamide and N-acetylcysteine in the treatment of chronic mountain sickness (Monge’s disease). *Resp Physiol Neurobiol* 2017;246:1–8.
237. Rivera-Ch M, Huicho L, Bouchet P, Richalet JP, León-Velarde F. Effect of acetazolamide on ventilatory response in subjects with chronic mountain sickness. *Resp Physiol Neurobiol* 2008;162(3):184–189.
238. Pichon A, Connes P, Quidu P, et al. Acetazolamide and chronic hypoxia: effects on haemorheology and pulmonary haemodynamics. *Eur Respir J* 2012;40(6):1401–1409.
239. Yu D, Liao JK. Emerging views of statin pleiotropy and cholesterol lowering. *Cardiovasc Res* 2021;118(2):413–423.

240. Amaru R, Villarroel M, Miguez H, et al. Hematopoietic Progenitor Cells From Patients with Chronic Mountain Sickness Lack the JAK2V617F Mutation, Show Hypersensitivity to Erythropoietin and Are Inhibited by Statins. *Blood* 2009;114(22):1894–1894.
241. Amaru R. Hidroxiurea en el tratamiento de eritrocitosis secundaria en adultos mayores contraindicados para flebotomía. *Revista De Hematología* 2020;21(2).
242. World Health Organization. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System [Internet]. 2011 [cited 2023 Apr 1]. Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85839/WHO\\_NMH\\_NHD\\_MNM\\_11.1\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85839/WHO_NMH_NHD_MNM_11.1_eng.pdf)
243. Sharma AJ, Addo OY, Mei Z, Suchdev PS. Reexamination of hemoglobin adjustments to define anemia: altitude and smoking. *Ann Ny Acad Sci* 2019;1450(1):190–203.
244. Sarna K, Gebremedin A, Brittenham GM, Beall CM. WHO hemoglobin thresholds for altitude increase the prevalence of anemia among Ethiopian highlanders. *Am J Hematol* 2018;93(9):E229–E231.
245. Sarna K, Brittenham GM, Beall CM. Current WHO hemoglobin thresholds for altitude and misdiagnosis of anemia among Tibetan highlanders. *Am J Hematol* 2020;95(6):E134–E136.
246. Gonzales GF, Celis VR de, Begazo J, et al. Correcting the cut-off point of hemoglobin at high altitude favors misclassification of anemia, erythrocytosis and excessive erythrocytosis. *Am J Hematol* 2018;93(1):E12–E16.
247. Ocas-Córdova S, Tapia V, Gonzales GF. Hemoglobin Concentration in Children at Different Altitudes in Peru: Proposal for [Hb] Correction for Altitude to Diagnose Anemia and Polycythemia. *High Alt Med Biol* 2018;19(4):398–403.
248. Mairbäurl H, Kilian S, Seide S, Muckenthaler MU, Gassmann M, Benedict RK. The Increase in Hemoglobin Concentration With Altitude Differs Between World Regions and Is Less in Children Than in Adults. *Hemasphere* 2023;7(4):e854.
249. Gonzales GF, Rubio J, Gasco M. Chronic mountain sickness score was related with health status score but not with hemoglobin levels at high altitudes. *Resp Physiol Neurobiol* 2013;188(2):152–160.
250. Leon-Velarde F, Ramos MA, Hernandez JA, et al. The role of menopause in the development of chronic mountain sickness. *Am J Physiology-regulatory Integr Comp Physiology* 1997;272(1):R90–R94.
251. Swenson ER. Chronic Mountain Sickness Evolving Over Time New Data From on High. *Chest* 2022;161(5):1136–1137.
252. Champigneulle B, Hanco I, Hamard E, et al. Excessive Erythrocytosis and Chronic Mountain Sickness in the Highest City in the World A Longitudinal Study. *Chest* 2022;161(5):1338–1342.

253. Cairo G, Champigneulle B, Correnti M, et al. Excessive Erythrocytosis Is Not Associated With Altered Iron Homeostasis in Men From the World's Highest City. *Hemasphere* 2023;7(3):e849.
254. Nguyen E, Harnois M, Busque L, et al. Phenotypical differences and thrombosis rates in secondary erythrocytosis versus polycythemia vera. *Blood Cancer J* 2021;11(4):75.
255. Gordeuk VR, Key NS, Prchal JT. Re-evaluation of hematocrit as a determinant of thrombotic risk in erythrocytosis. *Haematologica* 2019;104(4):653–658.
256. Zangari M, Fink L, Tolomelli G, et al. Could hypoxia increase the prevalence of thrombotic complications in polycythemia vera? *Blood Coagul Fibrin* 2013;24(3):311–316.
257. Weisel JW, Litvinov RI. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2019;17(2):271–282.
258. Jiang P, Wang Z, Yu X, et al. Effects of long-term high-altitude exposure on fibrinolytic system. *Hematology* 2021;26(1):503–509.
259. Yin Y, Geng H, Cui S, Hua-Ji L. Correlation of platelet-derived growth factor and thromboxane A2 expression with platelet parameters and coagulation indices in chronic altitude sickness patients. *Exp Physiol* 2022;107(8):807–812.
260. Martin DS, Pate JS, Vercueil A, et al. Reduced coagulation at high altitude identified by thromboelastography. *Thromb Haemostasis* 2017;107(06):1066–1071.
261. Roche AS, Paterson GG, Barber MT, et al. Thromboelastometry and Platelet Function during Acclimatization to High Altitude. *Thromb Haemostasis* 2018;118(01):063–071.
262. Pamenter ME, Hall JE, Tanabe Y, Simonson TS. Cross-Species Insights Into Genomic Adaptations to Hypoxia. *Frontiers Genetics* 2020;11:743.
263. Gordeuk VR, Miasnikova GY, Sergueeva AI, et al. Thrombotic risk in congenital erythrocytosis due to up-regulated hypoxia sensing is not associated with elevated hematocrit. *Haematologica* 2020;105(3):e87–e90.
264. Frezzato M, Tosetto A, Rodeghiero F. Validated Questionnaire for the Identification of Previous Personal or Familial Venous Thromboembolism. *Am J Epidemiol* 1996;143(12):1257–1265.
265. Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, et al. International Council for Standardisation in Haematology (ICSH) recommendations for collection of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021;43(4):571–580.
266. Lang T, Bauters A, Braun SL, et al. Multi-centre investigation on reference ranges for ROTEM thromboelastometry. *Blood Coagul Fibrin* 2005;16(4):301–310.
267. Nagler M, Kathriner S, Bachmann LM, Wuillemin WA. Impact of changes in haematocrit level and platelet count on thromboelastometry parameters. *Thromb Res* 2013;131(3):249–253.

268. Noorman F, Hess JR. The contribution of the individual blood elements to the variability of thromboelastographic measures. *Transfusion* 2018;58(10):2430–2436.
269. Solomon C, Rahe-Meyer N, Schöchl H, Ranucci M, Görlinger K. Effect of haematocrit on fibrin-based clot firmness in the FIBTEM test. *Blood Transfus* 2012;11(3):412–8.
270. Westbury SK, Lee K, Reilly-Stitt C, Tulloh R, Mumford AD. High haematocrit in cyanotic congenital heart disease affects how fibrinogen activity is determined by rotational thromboelastometry. *Thromb Res* 2013;132(2):e145–e151.
271. Rupa-Matysek J, Trojnarska O, Gil L, et al. Assessment of coagulation profile by thromboelastometry in adult patients with cyanotic congenital heart disease. *Int J Cardiol* 2016;202:556–560.
272. Tripodi A. Thrombin generation: a global coagulation procedure to investigate hypo- and hyper-coagulability. *Haematologica* 2020;105(9):2196–2199.
273. Tripodi A, Chantarangkul V, Gianniello F, et al. Global coagulation in myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol* 2013;92(12):1633–1639.
274. Şahin DG, Akay OM, Teke HU, Andic N, Gunduz E. Use of rotational thromboelastometry for a global screening of coagulation profile in patients of myeloproliferative neoplasms. *Platelets* 2021;32(2):280–283.
275. Kroll MH, Michaelis LC, Verstovsek S. Mechanisms of thrombogenesis in polycythemia vera. *Blood Rev* 2015;29(4):215–221.
276. Gangaraju R, Song J, Kim SJ, et al. Thrombotic, inflammatory, and HIF-regulated genes and thrombosis risk in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Adv* 2020;4(6):1115–1130.
277. Pujol C, Stöckl A, Mebus S, et al. Value of Rotational Thromboelastometry and Impedance Aggregometry for Evaluating Coagulation Disorders in Patients With Cyanotic and Nongenetic Congenital Heart Disease. *Am J Cardiol* 2019;123(10):1696–1702.
278. Gersh K, Nagaswami C, Weisel J. Fibrin network structure and clot mechanical properties are altered by incorporation of erythrocytes. *Thromb Haemostasis* 2009;102(06):1169–1175.
279. Lang T, Johanning K, Metzler H, et al. The Effects of Fibrinogen Levels on Thromboelastometric Variables in the Presence of Thrombocytopenia. *Anesthesia Analgesia* 2009;108(3):751–758.
280. Spiezia L, Campello E, Simioni P. “Hypocoagulable” thromboelastography profiles in patients with cyanotic congenital heart disease: Facts or technical artifacts? *Int J Cardiol* 2013;168(3):2914.
281. Marlar RA, Potts RM, Marlar AA. Effect on Routine and Special Coagulation Testing Values of Citrate Anticoagulant Adjustment in Patients With High Hematocrit Values. *Am J Clin Pathol* 2006;126(3):400–405.

282. Luddington RJ. Thrombelastography/thromboelastometry. *Clin Laboratory Haematol* 2005;27(2):81–90.
283. Tremblay JC, Hoiland RL, Howe CA, et al. Global REACH 2018: High Blood Viscosity and Hemoglobin Concentration Contribute to Reduced Flow-Mediated Dilatation in High-Altitude Excessive Erythrocytosis. *Hypertension* 2019;73(6):1327–1335.
284. Champigneulle B, Hanco I, Renan R, et al. High-Altitude Environment and COVID-19: SARS-CoV-2 Seropositivity in the Highest City in the World. *High Alt Med Biol* 2021;
285. Champigneulle B, Stauffer E, Robach P, et al. Early effects of acetazolamide on hemoglobin mass and plasma volume in chronic mountain sickness at 5100 m. *Pulmonology* 2023;
286. Siebenmann C, Keiser S, Robach P, Lundby C. CORP: The assessment of total hemoglobin mass by carbon monoxide rebreathing. *J Appl Physiol* 2017;123(3):645–654.
287. Hopkins WG. Measures of Reliability in Sports Medicine and Science. *Sports Med* 2000;30(1):1–15.
288. Rønnestad BR, Hamarsland H, Hansen J, et al. Five weeks of heat training increases haemoglobin mass in elite cyclists. *Exp Physiol* 2021;106(1):316–327.
289. Montero D, Breenfeldt-Andersen A, Oberholzer L, et al. Erythropoiesis with endurance training: dynamics and mechanisms. *Am J Physiology-regulatory Integr Comp Physiology* 2017;312(6):R894–R902.
290. Dandanell S, Oberholzer L, Keiser S, et al. Effect of alterations in blood volume with bed rest on glucose tolerance. *J Appl Physiol* 2016;121(5):1098–1105.
291. Turner G, Richardson AJ, Maxwell NS, Pringle JSM. Comparison of total haemoglobin mass measured with the optimized carbon monoxide rebreathing method across different Radiometer™ ABL-80 and OSM-3 hemoximeters. *Physiol Meas* 2014;35(12):N41–N49.
292. Wachsmuth N, Soria R, Jimenez J, Schmidt W. Modification of the CO-rebreathing method to determine haemoglobin mass and blood volume in patients suffering from chronic mountain sickness. *Exp Physiol* 2019;104(12):1819–1828.
293. Gunsolus IL, Love SA, Kohl LP, Schmidt M, Apple FS. Low pO<sub>2</sub> Contributes to Potential Error in Oxygen Saturation Calculations Using a Point-of-Care Assay. *Am J Clin Pathol* 2017;149(1):82–86.
294. Lewis CT, Malein WL, Chesner I, Clarke S, (BMRES) BMRES. High altitude arterialised capillary earlobe blood gas measurement using the Abbott i-STAT. *J Roy Army Med Corps* 2018;164(5):335.
295. Tymko MM, Hoiland RL, Tremblay JC, et al. The 2018 Global Research Expedition on Altitude Related Chronic Health (Global REACH) to Cerro de Pasco, Peru: an Experimental Overview. *Exp Physiol* 2020;106(1):86–103.

296. Willie CK, Stembridge M, Hoiland RL, et al. UBC-Nepal Expedition: An experimental overview of the 2016 University of British Columbia Scientific Expedition to Nepal Himalaya. *Plos One* 2018;13(10):e0204660.
297. Cook JD, Boy E, Flowers C, Daroca M del C. The influence of high-altitude living on body iron. *Blood* 2005;106(4):1441–1446.
298. Choque-Quispe BM, Paz V, Gonzales GF. Proportion of anemia attributable to iron deficiency in high-altitude infant populations. *Ann Hematol* 2019;98(11):2601–2603.
299. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag* 2015;11:133–148.
300. Li M, Tang X, Liao Z, et al. Hypoxia and low temperature up-regulate transferrin to induce hypercoagulability at high altitude. *Blood* 2022;140(19):2063–2075.
301. Vinchi F. Elevated Transferrin at High Altitude: Trick or Treat? *Hemasphere* 2023;7(3):e850.
302. Dijkhuizen P, Buursma A, Fongers TME, Gerding AM, Oeseburg B, Zijlstra WG. The oxygen binding capacity of human haemoglobin. *Pflügers Arch* 1977;369(3):223–231.
303. Gorelov V. Theoretical value of Hüfner’s constant. *Anaesthesia* 2004;59(1):97–97.

## 10. Annexe : autres publications produites pendant la période de thèse

Champigneulle B, Hanco I, Renan R, Doutreleau S, Stauffer E, Pichon A, Brugniaux JV, Péré H, Bouzat P, Veyer D, Verges S. High-Altitude Environment and COVID-19: SARS-CoV-2 Seropositivity in the Highest City in the World. *High Alt Med Biol* 2021.

Champigneulle B, Davranche K, Brugniaux JV, Baillieul S, Gajdos T, Doutreleau S, Robach P, Bouzat P, Verges S. Effect of a speed ascent to the top of Europe on cognitive function in elite climbers. *Eur J App Physiol* 2022;122(3):635-649.

Champigneulle B, Doutreleau S, Baillieul S, Brugniaux JV, Robach P, Bouzat P, Verges S. Changes in cardiac function following a speed ascent to the top of Europe at 4,808 m. *Eur J App Physiol* 2022;122(4):889-902.

Champigneulle B, Reinhard L, Mademilov M, Marillier M, Ulrich T, Carta AF, Scheiwiller P, Shabykeeva SB, Seraliev UU, Abdraeva AK, Magdieva KM, Mirzalieva G, Taalaibekova AT, Ozonova AK, Erkinbaeva AO, Shakiev NU, Azizbekov SA, Ainslie PN, Sooronbaev TM, Ulrich S, Bloch KE, Verges S, Furian M. Validation of Noninvasive Assessment of Pulmonary Gas Exchange in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease during Initial Exposure to High Altitude. *J Clin Med* 2023; 12(3):795.

# High-Altitude Environment and COVID-19: SARS-CoV-2 Seropositivity in the Highest City in the World

Benoit Champigneulle, MD, MSc,<sup>1,i</sup> Ivan Hancoo, MD, MSc,<sup>1</sup> Richard Renan, MS,<sup>2</sup>  
Stéphane Doutreleau, MD, PhD,<sup>1</sup> Emeric Stauffer, MD, MSc,<sup>3,4</sup> Aurélien Pichon, PhD,<sup>5</sup>  
Julien V. Brugniaux, PhD,<sup>1</sup> Hélène Péré, Pharm D, PhD,<sup>6,7</sup> Pierre Bouzat, MD, PhD,<sup>8</sup>  
David Veyer, Pharm D, PhD,<sup>6,7</sup> and Samuel Verges, PhD<sup>1</sup>

## Abstract

Champigneulle, Benoit, Ivan Hancoo, Richard Renan, Stéphane Doutreleau, Emeric Stauffer, Aurélien Pichon, Julien V. Brugniaux, Hélène Péré, Pierre Bouzat, David Veyer, and Samuel Verges. High-altitude environment and COVID-19: SARS-CoV-2 seropositivity in the highest city in the world. *High Alt Med Biol.* 22: 000–000, 2021.

**Background:** A reduced coronavirus disease 2019 (COVID-19) diffusion has been suggested in high-altitude areas but remained questionable. Aims of this study were to estimate severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) seropositivity as well as the risk factors associated in La Rinconada, the highest city in the world (5,100–5,300 m), a gold-mining town located in southeastern Peru where >50,000 dwellers live in precarious sanitary conditions.

**Materials and Methods:** We performed a cross-sectional study during a 1-week period in October 2020, using point-of-care lateral flow serological assays allowing detection of antibodies directed against SARS-CoV-2 among voluntary dwellers in La Rinconada. Participants were also questioned about potential occupational and environmental risk factors of COVID-19 occurrence.

**Results:** In a sample of 159 dwellers tested in La Rinconada, 48.4% [95% confidence interval, CI: 40.5–56.4] were seropositive for the SARS-CoV-2. Occurrence of at least one symptom compatible with the COVID-19 over the past 6 months remained the only significant factor associated with SARS-CoV-2 seropositivity (adjusted odds ratio: 3.27; [95% CI: 1.70–6.44];  $p < 0.001$ ).

**Conclusions:** The high rate of SARS-CoV-2 seropositivity observed in this small sample of highlanders does not support a protective effect of high-altitude against the COVID-19 spread and demonstrates its large dissemination in vulnerable populations.

Clinical Trial Registration number: NCT04604249.

**Keywords:** COVID-19; high altitude; prevalence; SARS-CoV-2

<sup>1</sup>HP2 Laboratory, INSERM U1300, Grenoble Alpes University, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France.

<sup>2</sup>Asociación Científica de Estudiantes de Medicina (ACEM–UNA), Universidad Nacional del Altiplano (UNA), Puno, Perú.

<sup>3</sup>Laboratory LIBM EA7424, Team “Vascular Biology and Red Blood Cell,” University of Lyon 1, Lyon, France.

<sup>4</sup>Exploration Fonctionnelle Respiratoire, Médecine du Sport et de l’activité Physique, Hospices Civils de Lyon, Hôpital de la Croix Rousse, Lyon, France.

<sup>5</sup>Laboratoire Move EA 6314, Faculté des Sciences du Sport, Université de Poitiers, Poitiers, France.

<sup>6</sup>Laboratoire de Virologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France.

<sup>7</sup>Unité de Génomique Fonctionnelle des Tumeurs Solides, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Université de Paris, Paris, France.

<sup>8</sup>Univ. Grenoble Alpes, Inserm, U1216, CHU Grenoble Alpes, Grenoble Institut Neurosciences, Grenoble, France.

<sup>i</sup>ORCID ID (<https://orcid.org/0000-0003-0922-5102>).

## Introduction

SINCE EARLY 2020 AND its rapid pandemic outbreak, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), causing coronavirus disease 2019 (COVID-19), spreads over the world (Hu et al., 2020). Despite the early setup of strict barrier measures including a prolonged lockdown from mid-March (Garcia et al., 2020), Peru seems to be one of the most impacted countries in the world after the first 6-month of COVID-19 pandemic with >900,000 positive cases and 34,000 deaths (Covid 19 en el Perú—Ministerio del Salud).

Interestingly, a reduced COVID-19 diffusion has been recently suggested in high-altitude areas (Arias-Reyes et al., 2020; Segovia-Juarez et al., 2020). Underlying aspiring hypotheses include phenotypic adaptation (i.e., a possible reduction in angiotensin-converting enzyme 2, ACE-2, expression in highlanders due to chronic hypoxic exposure), or environmental factors, such as potential protective effect of a higher ultraviolet radiation. However, these assumptions remain largely questionable (Pun et al., 2020) but of particular interest for countries with large highland areas such as Peru.

La Rinconada, known as the highest city in the world, is a gold-mining town located in the southeastern Peru at an altitude of 5,100–5,300 m where an estimated population of >50,000 dwellers live in precarious sanitary conditions (Enserink, 2019). We recently reported that highlanders permanently living at such an extreme altitude exhibited severe chronic hypoxemia, leading to excessive erythrocytosis (EE) and chronic mountain disease (CMS), a specific high-altitude comorbidity (Hanco et al., 2020; Oberholzer et al., 2020). In contrast to a putative protective effect of high altitude against SARS-CoV-2, crowded and precarious living conditions have been shown to be associated with a high seroprevalence for SARS-CoV-2 (Del Brutto et al., 2020; Roederer et al., 2021).

Hence, we aimed to investigate the SARS-CoV-2 seropositivity rate among a sample of high-altitude dwellers of La Rinconada after the first epidemic peak of COVID-19 in Peru, as well as the risk factors associated with a seroconversion.

## Materials and Methods

We conducted a cross-sectional study in October 2020, in the highest city in the world (La Rinconada, Peru, 5,100–5,300 m) to estimate the seropositivity rate for the SARS-CoV-2. During a 1-week period, all adult inhabitants of La Rinconada who freely reported for a medical check-up to a transient medical and research laboratory established in the mining cooperative building located in the main street of the town (Enserink, 2019) were enrolled in the study and subjected to a serologic COVID-19 test, after giving their written informed consent. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the ethic committee of the Centro Médico Naval Santiago Távara (Lima, Peru). The study was registered in the Clinical-Trial.gov registry. The primary outcome was the rate of seropositive highlanders for SARS-CoV-2 among the participants tested. Secondary outcomes included the risk factors (occupational and environmental) identified as being potentially associated with SARS-CoV-2 seroconversion.

Serologic testing was conducted in the field using a lateral flow immune-chromatographic assay (COVID-PRESTO<sup>®</sup>, AAZ, Boulogne-Billancourt, France). This point-of-care (POC) test allows for the detection of both IgM and IgG

antibodies directed against the N-protein of the SARS-CoV-2, from a capillary blood sample (obtained from a finger prick) with a specificity of 100% and an IgG sensitivity up to 100% when testing >15 days after the onset of COVID-19 symptoms (Prazuck et al., 2020). The tests were interpreted by two investigators (B.C., I.H.). Seropositivity was defined as the presence of a colored band for IgG testing  $\pm$  IgM. In addition to SARS-CoV-2 testing, hemoglobin concentration ([Hb]) was assessed (Hemocue AB, Angelholm, Sweden). The presence of EE ([Hb]  $\geq$ 21 g/dl for male and  $\geq$ 19 g/dl for female) and CMS (based on the [Hb] concentration and the Quinghai CMS symptom score) was reported (Hanco et al., 2020; Oberholzer et al., 2020). Demographic, occupational, and house characteristics, as well as the occurrence of at least one symptom compatible with a COVID-19 illness in the previous 6 months, were recorded (Hu et al., 2020).

Rate of positive SARS-CoV-2 serology in the tested population was reported with its 95% confidence interval (CI). A univariate analysis was first performed between seropositive and seronegative participants. Categorical variables, expressed in numbers and percentages (%), were compared using Pearson chi-squared test; continuous variables, expressed in mean  $\pm$  standard deviation or median (25–75th percentiles) as appropriate, were compared using a Student *t*-test or a Mann–Whitney *U*-test. To identify independent predictors of SARS-CoV-2 seroconversion, we then performed a multivariate logistic regression analysis including the variables with a *p*-value <0.20 in the univariate analysis and previously identified factors of SARS-CoV-2 seropositivity in crowded and precarious living conditions (Del Brutto et al., 2020; Roederer et al., 2021). Using a backward stepwise selection, only significant variables (*p* < 0.05) were retained in the final model. All statistical analyses were performed using R version 3.4.2 for Mac OS, GNU General Public Licenses GNU (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

## Results

During the study period, 159 POC serologic tests were performed in La Rinconada. Among them, 77 were positive (IgG only: 58/77 [75.3%] tests; both IgM and IgG: 19/77 [24.7%] tests), corresponding to a seropositivity rate of 48.4% [95% CI: 40.5–56.4] in the sample of inhabitants tested. Demographic and occupational characteristics of the tested population are reported in Table 1. Except for the presence of EE, CMS, and overweight, the only reported comorbidity was a medical history of hypertension in four (2.5%) subjects. All participants but eight (95%) were native highlanders, that is, born >2,500 m. No demographic or occupational characteristics differed among the seropositive and seronegative inhabitants of La Rinconada in the univariate analysis, whereas seropositive inhabitants lived in more crowded housing conditions (Table 1). In the multivariate analysis, reporting symptoms over the past 6 months (i.e., occurrence of at least one symptom compatible with the COVID-19, see Table 1) remained the only significant factor associated with SARS-CoV-2 seropositivity (adjusted odds ratio: 3.27; [95% CI: 1.70–6.44]; *p* < 0.001).

## Discussion

The main finding of our study is the high seropositivity rate for SARS-CoV-2, reaching  $\sim$ 50%, in a sample of Peruvian

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE HIGHLANDERS FROM LA RINCONADA INCLUDED IN THE STUDY, ACCORDING TO THE SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME CORONAVIRUS 2 SEROLOGIC STATUS

	Total participants (N=159)	Seronegative participants (N=82)	Seropositive participants (N=77)	p <sup>a</sup>
Age (years) <sup>b</sup>	42 ± 12	42 ± 12	41 ± 11	0.66
Gender <sup>b</sup>				
Male	126 (79%)	63 (77%)	63 (82%)	0.556
Female	33 (21%)	19 (23%)	14 (18%)	
Body mass index (kg/m) <sup>b</sup>				
≥18.5 and <25 (normal weight)	57 (36%)	26 (32%)	31 (40%)	0.53
≥25 and <30 (overweight)	78 (49%)	43 (52%)	35 (46%)	
≥30 (obese)	24 (15%)	13 (16%)	11 (14%)	
Residency in La Rinconada (years)	12 (5–20)	11 (3–20)	13 (5–20)	0.26
SpO <sub>2</sub> (%)	80 ± 5	80 ± 5	81 ± 5	0.21
EE	88 (55%)	49 (60%)	39 (51%)	0.32
Presence of CMS	22 (14%)	13 (16%)	9 (12%)	0.60
Education level				
Primary education	27 (17%)	14 (17%)	13 (17%)	0.62
Secondary education	88 (55%)	48 (59%)	40 (52%)	
Tertiary education	44 (28%)	20 (24%)	24 (31%)	
Occupation				
Miner	103 (65%)	50 (61%)	53 (69%)	0.32
Merchant	35 (22%)	22 (27%)	13 (17%)	
Other work	21 (13%)	10 (12%)	11 (14%)	
Working during lockdown				
Yes	35 (22%)	20 (24%)	15 (19%)	0.58
No	124 (78%)	62 (76%)	62 (81%)	
Location during lockdown				
La Rinconada (5,100 m)	46 (29%)	26 (32%)	20 (26%)	0.53
Other (<5,100 m) <sup>c</sup>	113 (71%)	56 (68%)	57 (74%)	
Duration of stay at lower altitude during lockdown <sup>d</sup>	12 [8–12]	12 [8–12]	12 [8–12]	
House characteristics				
Number of adults	2 (1–3)	2 (2–3)	2 (1–3)	0.52
Number of children <sup>b</sup>	1 (0–2)	1 (0–3)	1 (0–2)	0.07
Number of rooms <sup>b</sup>	2 (1–3)	2 (1–3)	2 (1–2)	0.02
Number of beds <sup>b</sup>	3 (1–4)	3 (2–4)	2 (1–3)	0.04
Use of public latrines				
Yes	116 (73%)	59 (72%)	57 (74%)	0.91
No	43 (27%)	23 (28%)	20 (26%)	
Main meal place				
Out of home	79 (50%)	37 (45%)	42 (55%)	0.30
Home	80 (50%)	45 (55%)	35 (45%)	
COVID-19-compatible symptom(s) during the past 6 months <sup>b,c</sup>	64 (40%)	22 (27%)	42 (55%)	0.001
Infectious close contact among the past 6 months	104 (65%)	51 (62%)	53 (69%)	0.48

Data are expressed as mean ± SD, median (25th–75th percentiles) or number (%).

<sup>a</sup>Seronegative versus seropositive participants.

<sup>b</sup>Factors included in multivariate analysis.

<sup>c</sup>Only two subjects went <3,000 m during lockdown.

<sup>d</sup>For subjects staying at lower altitude during lockdown.

<sup>e</sup>At least one symptom among fever, dry cough, chills, sore throat, asthenia, headache (more than usual), chest pain, dyspnea, diarrhea, loss of taste and/or smell, nasal obstruction, rhinorrhea, and myalgia.

CMS, chronic mountain disease; COVID-19, coronavirus disease 2019; EE, excessive erythrocytosis; SD, standard deviation.

highlanders permanently living at 5,100 m in La Rinconada, the highest city in the world. This finding challenges the assumptions of previous studies arguing in favor of a protective feature of permanent high-altitude residency against SARS-CoV-2 infection (Arias-Reyes et al., 2020; Segovia-Juarez et al., 2020). A potential downregulation of ACE-2 in highlanders chronically exposed to hypoxia remains highly

speculative, being only based on experimental and *in vivo* data, whereas it is challenged by some other results (Pun et al., 2020). A lower population density in high-altitude than in low-altitude areas may also represent an environmental confounding factor to explain the low incidence rate of COVID-19 reported previously >2,500 m (Arias-Reyes et al., 2020; Pun et al., 2020). Furthermore, interpretation of global

available epidemiologic data regarding SARS-CoV-2 as previously reported (Arias-Reyes et al., 2020; Segovia-Juarez et al., 2020) must be done cautiously because testing policy may considerably vary among countries and regions. Few contemporary epidemiologic studies are available to compare our findings with low-altitude areas in Peru. However, the seropositivity rate observed in this study is more than twice that the cumulated percentage of test positivity recorded in the Puno county (3,800 m), despite it being in the same region of Peru (Covid 19 en el Perú—Ministerio del Salud). Moreover, it is also comparable with the prevalence observed in France in precarious conditions during the first lockdown (Roederer et al., 2021) or in a relatively similar rural population in South America (Del Brutto et al., 2020). Among occupational, demographic, and lifestyle factors, reporting symptoms during the last months was the only independent factor associated with COVID-19 occurrence; in multivariate analysis, we could not observe any association between COVID-19 occurrence and crowded or precarious sanitary conditions, as previously demonstrated (Del Brutto et al., 2020; Roederer et al., 2021). Our limited sample size may have contributed to this lack of significant relationship, as well as the homogeneous level of precarity in the studied population (as reflected by the high rate of public latrine use, reflecting the absence of sewage system in the city). Our study was not designed to assess the risk factors of developing severe COVID-19 in highlanders. Interestingly, Segovia-Juarez et al. (2020) who reported a lower incidence rate of COVID-19 in high-altitude areas reported a similar case fatality rate as in low-altitude areas. As shown in this and our previous studies (Hancco et al., 2020; Oberholzer et al., 2020), although consisting of relatively young and active workers, the population of La Rinconada is characterized by a profound and chronic hypoxemia (as reflected by a mean SpO<sub>2</sub> of 80%) and by a high prevalence of EE (which may promote severe complications such as high-altitude pulmonary hypertension and right heart failure, mostly underdiagnosed in a precarious environment with limited health care access). Thereby, we believe that these specific high-altitude comorbidities may represent potential worsening factors when severe COVID-19 occurred, making this population particularly vulnerable in case of critical illness.

As no global population census is available, we cannot certify that our small sample was representative of the population of La Rinconada and, therefore, that the observed seropositivity rate among our sample reflects the true SARS-CoV-2 seroprevalence in La Rinconada. Nevertheless, the large proportion of men and mining workers in our sample seems concordant with the main local occupation in a gold-mining city and the demographic and physiological characteristics of these subjects are also concordant with our previous epidemiologic study (Hancco et al., 2020). Although we cannot totally exclude a selection bias of subjects with previous COVID-19 symptoms or in contact with infected people, we believe that by recruiting subjects who attended the laboratory for a global medical check-up, we avoided selecting individuals with a specific concern regarding the COVID-19. One should also acknowledge that the present findings may not be directly extrapolated to other high-altitude populations, living in different conditions from those of La Rinconada or at a less extreme altitude.

## Conclusion

The results of this study highlight that 6 months after the pandemic outbreak of SARS-CoV-2, COVID-19 is far from being a scarce illness at high altitude. Poor sanitary conditions as in the city of La Rinconada are likely to promote a large spread of SARS-CoV-2 in vulnerable populations. Further studies are needed regarding SARS-CoV-2 infection and management in high-altitude populations, especially to investigate risk factors and prognosis of severe COVID-19 in this setting.

## Authors' Contributions

B.C., I.H., R.R., S.D., E.S., A.P., J.V.B., H.P., P.B., D.V., and S.V. designed the study and acquired, analyzed, and interpreted the data. B.C. and S.V. performed the statistical analysis. B.C., I.H., and S.V. wrote the article; P.B. and D.V. revisited it for important intellectual content. All authors reviewed and approved the final version of the article.

## Acknowledgment

We thank the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), who graciously provided the serologic POC tests used in this study.

## Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

## Funding Information

This study was supported by the Grenoble Alpes University foundation, the “Fonds de dotation AGIR pour les maladies chroniques,” and by the French National Research Agency (ANR-12-TECS-0010) in the framework of the “Investissements d’avenir” program (ANR-15-IDEX-02).

## References

- Arias-Reyes C, Zubieta-DeUrioste N, Poma-Machicao L, Aliaga-Raduan F, Carvajal-Rodriguez F, Dutschmann M, Schneider-Gasser EM, Zubieta-Calleja G, and Soliz J. (2020). Does the pathogenesis of SARS-CoV-2 virus decrease at high-altitude? *Respirat Physiol Neurobiol* 277:103443.
- Covid 19 en el Perú—Ministerio del Salud. (2020). Available at [https://covid19.minsa.gob.pe/sala\\_situacional.asp](https://covid19.minsa.gob.pe/sala_situacional.asp) (accessed November 6, 2020).
- Del Brutto OH, Costa AF, Mera RM, Recalde BY, Bustos JA, and García HH. (2020). SARS-CoV-2 in rural Latin America. A population-based study in coastal Ecuador. *Clinical Infectious Diseases* ciaa1055. [Epub ahead of print]; DOI: 10.1093/cid/ciaa1055.
- Enserink M. (2019). Hypoxia city. *Science* 365:1098–1103.
- García PJ, Alarcón A, Bayer A, Buss P, Guerra G, Ribeiro H, Rojas K, Saenz R, Salgado de Snyder N, Solimano G, Torres R, Tobar S, Tuesca R, Vargas G, and Atun R. (2020). COVID-19 response in Latin America. *Am J Trop Med Hygiene* 103:1765–1772.
- Hancco I, Bailly S, Bailleuil S, Doutreleau S, Germain M, Pépin J-L, and Vergès S. (2020). Excessive erythrocytosis and chronic mountain sickness in dwellers of the highest city in the world. *Front Physiol* 11:773.
- Hu B, Guo H, Zhou P, and Shi Z-L. (2020). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* 19: 141–154.

- Oberholzer L, Lundby C, Stauffer E, Ulliel-Roche M, Hanco I, Pichon A, Lundby A-KM, Villafuerte FC, Verges S, and Robach P. (2020). Reevaluation of excessive erythrocytosis in diagnosing chronic mountain sickness in men from the world's highest city. *Blood* 136:1884–1888.
- Prazuck T, Colin M, Giachè S, Gubavu C, Seve A, Rzepecki V, Chevereau-Choquet M, Kiani C, Rodot V, Lionnet E, Courtellemont L, Guinard J, Pialoux G, and Hocqueloux L. (2020). Evaluation of performance of two SARS-CoV-2 Rapid IgM-IgG combined antibody tests on capillary whole blood samples from the fingertip. *PLoS One* 15:e0237694.
- Pun M, Turner R, Strapazon G, Brugger H, and Swenson ER. (2020). Lower incidence of COVID-19 at high altitude: Facts and confounders. *High Alt Med Biol* 21:217–222.
- Roederer T, Mollo B, Vincent C, Nikolay B, Llosa AE, Nesbitt R, Vanhomwegen J, Rose T, Goyard S, Anna F, Torre C, Fourrey E, Simons E, Hennequin W, Mills C, and Luquero FJ. (2021). Seroprevalence and risk factors of exposure to COVID-19 in homeless people in Paris, France: A cross-sectional study. *Lancet Public Health* 6:e202–e209.
- Segovia-Juarez J, Castagnetto JM, and Gonzales GF. (2020). High altitude reduces infection rate of COVID-19 but not case-fatality rate. *Respirat Physiol Neurobiol* 281:103494.

Address correspondence to:  
*Benoit Champigneulle, MD, MSc*  
*HP2 Laboratory*  
*INSERM U1300*  
*Grenoble Alpes University*  
*CHU Grenoble Alpes*  
*UM Sports Pathologies*  
*Hôpital Sud, Avenue Kimberley*  
*Echirolles*  
*Grenoble 38434*  
*France*

*E-mail:* bchampigneulle@chu-grenoble.fr

Received January 28, 2021;  
accepted in final form May 2, 2021.



# Effect of a speed ascent to the top of Europe on cognitive function in elite climbers

Benoit Champigneulle<sup>1</sup> · Karen Davranche<sup>2</sup> · Julien Vincent Brugniaux<sup>1</sup> · Sébastien Baillieux<sup>1</sup> · Thibault Gajdos<sup>2</sup> · Stéphane Doutreleau<sup>1</sup> · Paul Robach<sup>1,3</sup> · Pierre Bouzat<sup>4</sup> · Samuel Verges<sup>1</sup>

Received: 19 June 2021 / Accepted: 19 November 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021, corrected publication 2021

## Abstract

**Purpose** The combined effects of acute hypoxia and exercise on cognition remain to be clarified. We investigated the effect of speed climbing to high altitude on reactivity and inhibitory control in elite climbers.

**Methods** Eleven elite climbers performed a speed ascent of the Mont-Blanc (4810 m) and were evaluated pre- (at 1000 m) and immediately post-ascent (at 3835 m). In both conditions, a Simon task was done at rest (single-task session, ST) and during a low-intensity exercise (dual-task session, DT). Prefrontal cortex (PFC) oxygenation and middle cerebral artery velocity (MCAv) were monitored using near-infrared spectroscopy and transcranial Doppler, respectively, during the cognitive task. Self-perceived mental fatigue and difficulty to perform the cognitive tests were estimated using a visual analog scale. Heart rate and pulse oxygenation (SpO<sub>2</sub>) were monitored during the speed ascent.

**Results** Elite climbers performed an intense (~50% of the time ≥ 80% of maximal heart rate) and prolonged (8h58 ± 6 min) exercise in hypoxia (minimal SpO<sub>2</sub> at 4810 m: 78 ± 4%). Reaction time and accuracy during the Simon task were similar pre- and post-ascent (374 ± 28 ms vs. 385 ± 39 ms and 6 ± 4% vs. 5 ± 4%, respectively; *p* > 0.05), despite a reported higher mental fatigue and difficulty to perform the Simon task post-ascent (all *p* < 0.05). The magnitude of the Simon effect was unaltered (*p* > 0.05), suggesting a preserved cognitive control post-ascent. Pattern of PFC oxygenation and MCAv differed between pre- and post-ascent as well as between ST and DT conditions.

**Conclusions** Cognitive control is not altered in elite climbers after a speed ascent to high-altitude despite substantial cerebral deoxygenation and fatigue perception.

**Keywords** Altitude · Reaction time · Cognitive control · Simon task · Exercise

## Abbreviations

AMS Acute mountain sickness  
ANOVA Analysis of variance

BL Baseline  
CaO<sub>2</sub> Oxygen arterial content  
CO Congruent  
DT Dual task  
ESM Electronic supplementary material  
fNIRS Functional near-infrared spectroscopy  
[Hb] Hemoglobin concentration  
[HHb] Deoxyhemoglobin  
[HbO<sub>2</sub>] Oxyhemoglobin  
[HbTot] Total hemoglobin  
HR Heart rate  
IN Incongruent  
MCA Middle cerebral artery  
MCAv Middle cerebral artery mean velocity  
MCA DO<sub>2</sub> Cerebral oxygen delivery through the middle cerebral artery  
PFC Prefrontal cortex  
SpO<sub>2</sub> Pulse oxygen saturation

Communicated by Guido Ferretti.

Pierre Bouzat and Samuel Verges: share senior authorship.

✉ Benoit Champigneulle  
BChampigneulle@chu-grenoble.fr

<sup>1</sup> Univ. Grenoble Alpes, Inserm U1300, CHU Grenoble Alpes, HP2 laboratory, Grenoble, France

<sup>2</sup> Aix Marseille University, CNRS, LNC, Marseille, France

<sup>3</sup> National School for Mountain Sports, Site of the National School for Skiing and Mountaineering (ENSA), Chamonix, France

<sup>4</sup> Univ. Grenoble Alpes, Inserm, U1216, CHU Grenoble Alpes, Grenoble Institut Neurosciences, Grenoble, France

ST	Single task
TCD	Transcranial Doppler
TSI	Tissue oxygen saturation index

## Introduction

High-altitude mountaineering requires specific physiological characteristics including high aerobic capacity (Puthon et al. 2016). Alpinists, often practicing their sport in extreme (e.g. weather conditions including low temperature, wind and snow) and hazardous (e.g. risk of fall, rock-fall and avalanche burial) environments, also require a full-preservation of their cognitive abilities to rapidly make crucial decisions and avoid accidents (Wickens et al. 2015).

Acute exposure to high altitude-related hypobaric hypoxia can induce neurological changes of variable magnitude, mainly depending on the altitude level, the speed of ascent and individual susceptibility (Wilson et al. 2009). Thereby, acute hypoxic exposure has detrimental effects on cognitive performances, the magnitude of which probably depending on the severity of hypoxemia (McMorris et al. 2017), and which could be attenuated by acclimatization (Davranche et al. 2016). An acute bout of physical exercise is also known to influence cognitive performance depending of the type of cognitive task, the exercise intensity and duration, the timing of evaluation (i.e. during or after exercise) as well as the population evaluated (e.g. trained or untrained status) (Lambourne and Tomporowski 2010; McMorris and Hale 2012; Browne et al. 2017). In a meta-analysis (McMorris and Hale 2012), a positive effect of moderate-intensity exercise was only reported on speed processing supporting the theory of a hormetic effect of exercise intensity on cognition. On another hand, the effect of acute physical activity on executive functions, which is crucial for rapid decision-making and includes more elaborated tasks such as inhibitory control, interference control and cognitive flexibility (Diamond 2013), remains equivocal (Davranche and McMorris 2009; Davranche et al. 2015).

Mountaineering combines high-altitude exposure and sustained exercise, especially during a speed ascent (i.e. reaching summits as fast as possible). Thus, understanding the impact of both hypoxia and physical activity on cognition is of major interest for mountaineers. In contrast with normoxic conditions, hypoxic exercise, even at submaximal intensities, impairs cerebral oxygenation (for review, see Verges et al. 2012), suggesting that strenuous exercise in hypoxia may be particularly prone to impairing cognitive processes. However, as emphasized in a recent review (Ando et al. 2020), available cognitive studies show diverging results, probably because the interaction effect between hypoxia and exercise may vary with the intensity and duration of exercise and/or the pattern of the hypoxic exposure.

For instance, Ochi et al. (2018) reported a decrease in cognitive performance during moderate exercise (50% of peak oxygen uptake) in hypoxia (3500 m equivalent) while others suggested preserved cognitive function during hypoxic exercise (simulated altitude: from 1300 to 4500 m; ~50% of maximal exercise capacity) (Lefferts et al. 2016; Komiyama et al. 2017, 2015; Ando et al. 2013). Conflicting results have also been reported regarding processing speed; the beneficial effect of a moderate-intensity exercise on reaction time seems preserved in hypoxia in some studies (Ando et al. 2013; Komiyama et al. 2015, 2017), whereas Lefferts et al. (2016) reported prolonged reaction time during exercise in hypoxia (at a 4100 m simulated altitude) vs. normoxia. All these studies (Ando et al. 2013; Komiyama et al. 2015, 2017; Lefferts et al. 2016; Ochi et al. 2018) have been conducted in a laboratory setting with a relatively short and moderate-intensity exercise. Field studies investigating the impact of combined exercise and altitude exposure are scarce and only evaluated the effect of gradual ascents to altitude while trekking over several days, which may be considered firstly as a low-to-moderate-intensity exercise and secondly, subjected to the confounding factor of progressive acclimatization (Limmer and Platen 2018; Algaze et al. 2020). Thus, the impact of prolonged and sustained exercise at high altitude (as performed during a speed ascent) on reaction time as well as cognitive control remains to be investigated. Furthermore, mountaineering practice requires the preservation of cognitive abilities during motor activities while in a hypoxic environment, i.e. not only at rest but also during climbing or walking on steep terrains. Simultaneously performing a motor and a cognitive task (dual tasking), requires coordination and sharing of limited attentional resources, as both tasks involve, in particular, the prefrontal cortex (PFC) (Miller and Cohen 2001; Leone et al. 2017). This process may be altered in a hypoxic environment, but the motor-cognitive dual-task interference in hypoxia remains largely underinvestigated (Hamacher et al. 2017).

Therefore, the main aim of this study was to evaluate the impact of a speed ascent to high altitude in elite climbers on reactivity and inhibitory control assessed by the Simon task performed in both single task (ST) and dual task (DT) setting. Furthermore, we aimed to describe the cerebral hemodynamic and oxygenation patterns during the cognitive task to study potential links between changes in cerebral oxygen delivery and neurocognitive function. We hypothesized that both reaction time and inhibitory control would be impaired after a sustained and long-duration effort in hypoxia, especially in DT, and that these impairments would be associated with a decrease in cerebral oxygen delivery and oxygenation.

## Materials and methods

### Participants

Eleven elite climbers (9 males and 2 females, age:  $26 \pm 4$  years, height:  $176 \pm 7$  cm, weight:  $67.0 \pm 9.0$  kg), members of the French national high-altitude climbing team (*Fédération Française des Clubs Alpains et de Montagne*), were included in the present study. All participants were healthy and fully trained to practice high-level climbing at high-altitude (peak oxygen uptake:  $61.0 \pm 5.9$  mL kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>; maximal heart rate:  $193 \pm 8$  bpm). None of them were smokers, had a history of severe high-altitude illness or took any medication at the time of the experiment. All participants, except one, had been exposed to an altitude over 3000 m during the previous month. Nine out of the 11 participants (82%) were right-handed and/or had postgraduate education.

This prospective and observational study was approved by a French ethic committee (CPP Ouest VI) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All participants were fully informed about the study and signed a written informed consent before inclusion.

### Protocol overview

#### Speed ascent

The climbers performed a speed ascent to the summit of the Mont-Blanc (the highest mountain of western Europe: 4808 m) starting from the valley (Chamonix-Les Houches, altitude: 1000 m), using the French normal route (altitude gain +3808 m; ~14 km distance) which includes various mountaineering conditions such as hiking, easy climbing and glacier crossing. After reaching the summit, the climbers went down to the Goûter hut (altitude: 3,835 m) where the effort ended (negative altitude gain from summit: -973 m, ~4 km distance). The start was staggered between participants from 1:30 to 3:00 AM (mean sleep time of participants during the night before departure: 3 h 25 min  $\pm$  26 min). No medication was administered during the ascent. Fluid and food intake during the ascent were unrestricted and not recorded. Heart rate (HR) was continuously monitored during the ascent using a HR transmitter chest belt (Suunto®, Vantaa, Finland; Garmin®, Olathe, Kansas, USA or Polar®, Kempele, Finland devices). Iterative measurements of pulse oxygen saturation (SpO<sub>2</sub>) at the different checkpoints of the route were performed. Acute mountain sickness (AMS) symptoms were evaluated during the ascent using the 2018 version of the Lake Louise Questionnaire (Roach et al. 2018) and the

Environmental Symptom Questionnaire (Sampson et al. 1983). AMS was defined as a Lake Louise questionnaire score  $\geq 3$  (with  $\geq 1$  point for headache symptom) and/or an AMS cerebral score  $\geq 0.70$  (Sampson et al. 1983; Roach et al. 2018).

#### Cognitive assessment

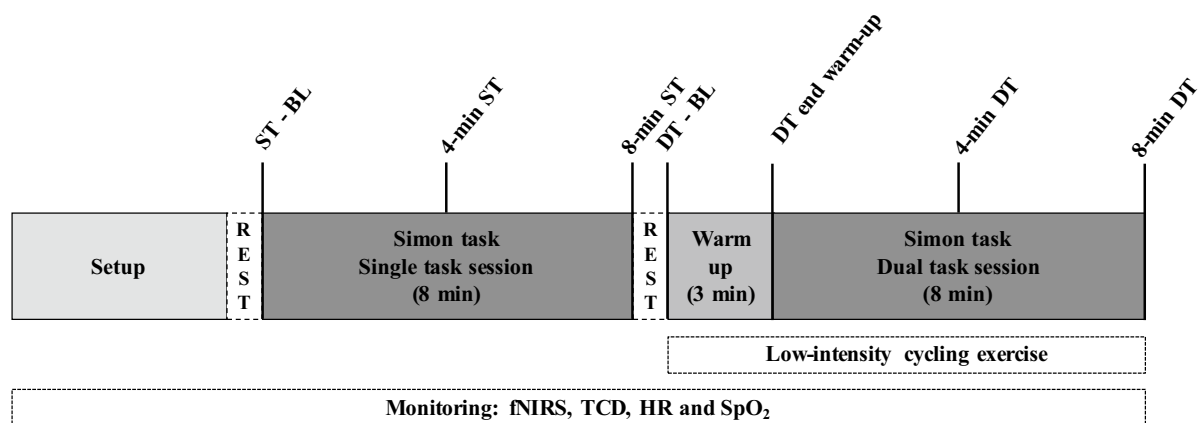
The same cognitive evaluations were conducted for all subjects before (pre-ascent condition) and immediately after the end of the speed ascent (post-ascent condition). Pre-ascent measurements were performed 2–3 days before the ascent at Chamonix-Les Houches (altitude: 1000 m; atmospheric pressure: 683 mmHg) and post-ascent measurements were conducted at the Goûter Hut (altitude: 3835 m; atmospheric pressure: 487 mmHg), as soon as possible after subjects' arrival.

The experimental cognitive protocol (Fig. 1) consisted of a 1-min resting baseline period followed by two successive 8-min sessions of the Simon task (see description below). The first Simon task session was performed at rest (single task, ST). As mountaineering requires cognitive abilities in a motor dual tasking context, the second Simon task session was performed during a low-intensity cycling exercise performed with an under-desk cycle ergometer (MagneTrainer, 3D Innovations, Colorado, USA) set at ~50 to 60 W, after a 3-min warm-up period (dual task, DT). The aim of adding of the physical exercise was to induce a distractive effect.

Both evaluations (pre- and post-ascent) were performed by the same experimenters and under similar experimental conditions (room temperature, sitting position, distance from the computer screen, cycling resistance). Cerebral blood flow velocity and oxygenation were continuously monitored (see description below) throughout the cognitive test. Duration of the procedure, including the setting up of the equipment, did not exceed 40 min.

#### Simon task

The Simon task is a validated conflict task consisting in a choice reaction time task providing information about the ability of participants to resist prepotent but inappropriate responses (for review, see: Simon 1990). The Simon task was performed sitting on a chair at a desk, with the participant at a controlled distance of 1 m from a computer screen. Hands were positioned on the desk, on a dedicated keyboard including a left and a right key. During the cognitive task, the participant was instructed to look at a white mark positioned in the center of a black screen. Then, a visual shape stimulus (a circle or a square) appeared randomly on the right or left side of the white mark (at a fixed distance of 7.5 cm from the center). When the stimulus appeared, the participants were asked to



**Fig. 1** Description of the cognitive evaluation protocol: two successive 8-min sessions of Simon task (at rest: single task (ST) session; during low-intensity cycling: dual task (DT) session) were performed in both pre-ascent (at 1000 m) and post-ascent (at 3835 m) condi-

tions, after a 1-min rest period before each session. *fNIRS* functional near-infrared spectrometry, *TCD* transcranial Doppler, *HR* heart rate, *SpO<sub>2</sub>* pulse oxygen saturation

provide the correct response as fast as possible by pressing the response-key of the keyboard corresponding to the stimulus (left or right) according to a rule given by the experimenter irrespective of the location of the stimulus. The response instruction (pressing the left key for a circle and the right key for a square or conversely) was counter-balanced among the participants and remained the same between pre-ascent and post-ascent evaluation. The task includes two equiprobable and randomized trials type: the congruent trials (CO), when the response key is ipsilateral to the stimulus side and the incongruent trials (IN), when the response key is contralateral to the stimulus side. The Simon effect corresponds to the lengthening of the reaction time in the IN trials compared to the CO trials induced by the response-based conflict in IN trials (Lu and Proctor 1995).

Immediately after pressing a response key or after a delay of 1.5 s, the stimulus disappears from the screen and a new trial started. The duration (8 min) of each session of the Simon task corresponded to about 210 trials. To avoid a learning effect during the experimental procedure, the first experimental session (pre-ascent) was preceded 24-h before by a standardized familiarization session, in the same environmental conditions. The familiarization session included a minimum of four blocks of 64 trials. Four additional training blocks could be performed if the following learning criteria were not met: (1) an intra-block reaction time variability below 25%, (2) an inter-block reaction time variability with the previous block below 5%, (3) a mean reaction time under 400 ms, (4) an error rate between 3 and 10%, and (5) the presence of a classical Simon effect (positive value).

## Monitoring during the cognitive assessment

### Physiological variables

HR and SpO<sub>2</sub> were continuously measured using an ear probe (ML320/E Oximeter Pod, ADInstruments, Sydney, Australia) during the cognitive evaluation and stored for subsequent analysis (Labchart v8.1.13, ADInstruments, Sydney, Australia). Hemoglobin concentration [Hb] was measured pre- and post-ascent (Hemocue® Hb201+, Hemocue AB, Ängelholm, Sweden). Oxygen arterial content (CaO<sub>2</sub>) was approximated, omitting dissolved O<sub>2</sub>, as follows:  $1.34 \times [\text{Hb}] \times \text{SpO}_2/100$ .

### Transcranial Doppler (TCD)

Velocity measurements from both right and left middle cerebral artery (MCA) were continuously registered in all participants during the cognitive assessment pre- and post-ascent (Fig. 1). Arteries were insonated using a 2 MHz pulsed-wave Doppler ultrasound system (Multi-Dop® T digital, DWL, Compumedics Ltd, Singen, Germany) applied to the temporal windows, and either MCA was found at a depth between 30 and 50 mm (Willie et al. 2011). A headband device (Dia-MonDWL, Compumedics Ltd, Singen, Germany) secured the Doppler probes over the trans-temporal windows was used to achieve and maintain optimal insonation position. MCA velocities were continuously sampled at 1000 Hz using an analog-to digital converter (Powerlab/16SP ML795; ADInstruments, Oxford, UK) and stored for subsequent analysis (Labchart v8.1.13, ADInstruments, Sydney, Australia). Same depth and transducer positions were

kept between the pre- and post-ascent trials. MCA mean velocities (MCAv) were calculated using the conventional formula:  $MCAv = (\text{systolic velocity} + 2 \cdot \text{diastolic velocity})/3$  and expressed in absolute values ( $\text{cm s}^{-1}$ ). Cerebral oxygen delivery through the MCA (MCA  $\text{DO}_2$ ) was estimated from:  $MCA \text{ DO}_2 = (MCAv \text{ left} + MCAv \text{ right}) \times CaO_2$  (arbitrary units, au).

### Functional near-infrared spectroscopy

During the cognitive task, PFC oxygenation, known to play a central role in executive functions (Miller and Cohen 2001), was assessed by functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) as previously reported (Davranche et al. 2016; Bouzat et al. 2018). Continuous measurement of oxyhemoglobin ( $[\text{HbO}_2]$ ,  $\mu\text{M}$ ), deoxyhemoglobin ( $[\text{HHb}]$ ,  $\mu\text{M}$ ), total hemoglobin  $[\text{HbTot}]$  ( $[\text{HbO}_2] + [\text{HHb}]$ ) and tissue oxygen saturation index (TSI, %) was performed over the left and right PFC, using two optodes (Portalite, Artinis Medical Systems, Einsteinweg, The Netherlands) positioned between Fp1 and F3 and between Fp2 and F4, respectively, according to the international 10–20 EEG system. Optodes were secured to the skin with a double-sided tape and further maintained by the TCD's headgear. Marks were drawn on the scalp to ensure the same position of the optodes between the two cognitive assessment sessions. fNIRS values were sampled at 50 Hz and stored for subsequent analysis (Oxysoft analysis program, v3.0.103.1, Artinis Medical Systems, Zetten, The Netherlands). Recorded fNIRS values (excepted TSI expressed in absolute value) were expressed in absolute variation ( $\Delta$ ) from the reference value registered at the end of the 1-min resting period that preceded each Simon task session (Fig. 1), to assess the changes induced by the cortical activation during the cognitive task (ST sessions) and by the combination of cognitive task and low-intensity exercise (DT sessions). During the resting periods, subjects were asked to stay quiet and relaxed with their eyes open.

### Subject-reported outcomes

Both during the pre- and post-ascent testing sessions, subjects were asked to evaluate their perceived mental fatigue in response to a standardized question (“On a scale from 0 to 10, 0 being no mental fatigue and 10 being extreme mental fatigue, how would you rate your current level of mental fatigue?”), before starting the cognitive assessment, then after the ST and DT Simon task sessions, using a visual analog scale ranging from 0 (no mental fatigue) to 10 (extremely fatigued). A similar visual analog scale (from 0: no difficulty to 10: extremely hard) was used to evaluate the perceived difficulty to perform the cognitive task, in response to a standardized question (“On a scale from 0 to 10, 0 being no difficulty and 10 being extreme difficulty, how

would you rate the difficulty of this task?”) after the ST and DT Simon task sessions.

### Outcomes

The primary outcome of the study was the reaction time during the Simon task. Secondary outcomes were the accuracy (i.e. the error rate) during the Simon task as well as the cerebral hemodynamic and oxygenation changes during the Simon task assessed by TCD and fNIRS, respectively.

### Data processing and statistical analysis

Categorical variables were expressed as numbers and percentages (%) and were compared using a Fischer test. Continuous variables were reported as means  $\pm$  standard deviation (SD), except for cognitive outcomes expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM) in the figures. After confirmation of the normality of the distribution for the main variables using a Shapiro–Wilk test, repeated measures of variance (ANOVA) were performed on each variable of interest. Sphericity was assessed using a Mauchly test and a Greenhouse–Geisser correction was applied in case of violation of the sphericity assumption. Effect size was reported using partial Eta squared ( $\eta_p^2$ ) for main effects and interactions. Post-hoc comparisons were performed using repeated paired sample *t* test with Bonferroni correction when a significant ANOVA effect was highlighted. In the absence of previously published data assessing the impact of a speed ascent to high-altitude on cognitive outcomes, especially in highly trained athletes, the present exploratory study did not involve any formal sample size calculation. Nevertheless, as the included participants ( $n = 11$ ) represented the entire French national high-altitude climbing team, all potential available participants were recruited for this study.

### Cognitive data

Individual responses shorter than 100 ms were considered as anticipated responses and were excluded from the analysis ( $n = 6$  trials). A three-way (ascent  $\times$  task  $\times$  congruency) repeated measures ANOVA was used for the analysis of the cognitive outcomes, where the ascent effect represented the effect of the speed ascent to high altitude, the task effect corresponded to the type of Simon task session (ST vs. DT) and the congruency effect corresponded to the type of trials (IN vs. CO trials). Owing to the small sample size, a sensitivity analysis using two distinct two-way (ascent  $\times$  congruency) repeated measures ANOVA for ST and DT Simon task sessions was also performed. Furthermore, to consider potential confounding factors that could influence the reaction time and accuracy post-ascent, sensitivity analyses using linear mixed models and generalized linear mixed models were

performed to verify whether the individual time of ascent, the level of hypoxemia (reflected by the pre-test  $\text{SpO}_2$ ), the delay between the end of the speed ascent and the post-ascent cognitive test, as well as the severity of AMS could affect the cognitive outcomes. Mental fatigue and difficulty to perform the Simon task reported by the subjects were analyzed using a two-way repeated measures ANOVA (ascent  $\times$  timing of assessment).

### Cerebral outcomes

TCD and fNIRS values were averaged over a 30-s period at different pre-determined timepoints during the cognitive test in both pre- and post-ascent conditions (Fig. 1): ST baseline (ST-BL), after 4 (4-min ST) and 8 min (8-min ST) during the ST Simon task session, DT baseline (DT-BL), end of warm-up before starting Simon task in DT session (DT end warm-up), after 4 (4-min DT) and 8 min (8-min DT) during the DT Simon task session. As the fNIRS data were expressed in absolute change from the rest reference value measured before the start of each Simon task session, two distinct analyses of the cerebral outcomes were performed according to the single or dual-task sessions of the Simon task. Because a preliminary three-way (ascent  $\times$  time  $\times$  side) ANOVA for all TCD and fNIRS variables did not show any main effect or interaction effect of the side (right vs. left), the average of both sides was subsequently used in a two-way (ascent  $\times$  time) ANOVA.

All tests were two-sided and a  $p$ -value  $< 0.05$  was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using R version 3.4.2 for Mac OS, GNU General Public Licenses GNU (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) and were plotted using GraphPad Prism version 9.0.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## Results

### Speed ascent characteristic

All the climbers reached the summit in an average time of 7 h 10 min  $\pm$  42 min. The total mean effort duration including the downhill section until the Goûter Hut (where the post-ascent evaluations were performed) was 8 h 58  $\pm$  60 min. During the ascent, climbers remained 49  $\pm$  18% of the total time above 80% of maximal HR. Above 3835 m,  $\text{SpO}_2$  measurements ranged from an average value of 83  $\pm$  4% at 3,835 m during the ascent to an average value of 71  $\pm$  4% at 4,808 m (summit arrival). Mean  $\text{SpO}_2$  value measured immediately after arrival at the Goûter Hut was 78  $\pm$  4%. During the ascent, Lake Louise score and AMS cerebral score were maximal at summit arrival (4,808 m

and then shown a trend to decrease after the way down to the Goûter hut (from 3.6  $\pm$  1.4 to 2.8  $\pm$  1.3 and from 0.6  $\pm$  0.5 to 0.5  $\pm$  0.4, respectively, all  $p > 0.05$ ). According to the Lake Louise score, 36% of the participants exhibited mild AMS symptoms immediately after arrival at the Goûter hut (just before starting post-ascent cognitive test), a proportion that was not statistically different when considering AMS cerebral score (18% of subjects;  $p = 0.64$  vs. Lake Louise score).

### Cognitive test

All the climbers completed both pre- and post-ascent cognitive evaluations. Post-ascent evaluation started on average 64  $\pm$  36 min after arrival at the Goûter hut. The main findings regarding the Simon task are presented in the Fig. 2; the individual data are provided in the Fig. S1 in Electronic Supplementary Material (ESM) 1.

#### Reaction time

The speed ascent had no significant effect on mean reaction time (Fig. 2A). The reaction time was longer in IN trials than in CO trials (+20  $\pm$  12 ms,  $p < 0.001$ , Fig. 2A), reflecting the classical Simon effect, without any change in the Simon effect according to the speed ascent (no significant ascent  $\times$  congruency interaction). The reaction time was shorter in DT sessions than in ST sessions (−13  $\pm$  16 ms,  $p = 0.02$ , Fig. 2A), without any change from pre- to post-ascent (no significant task  $\times$  ascent interaction).

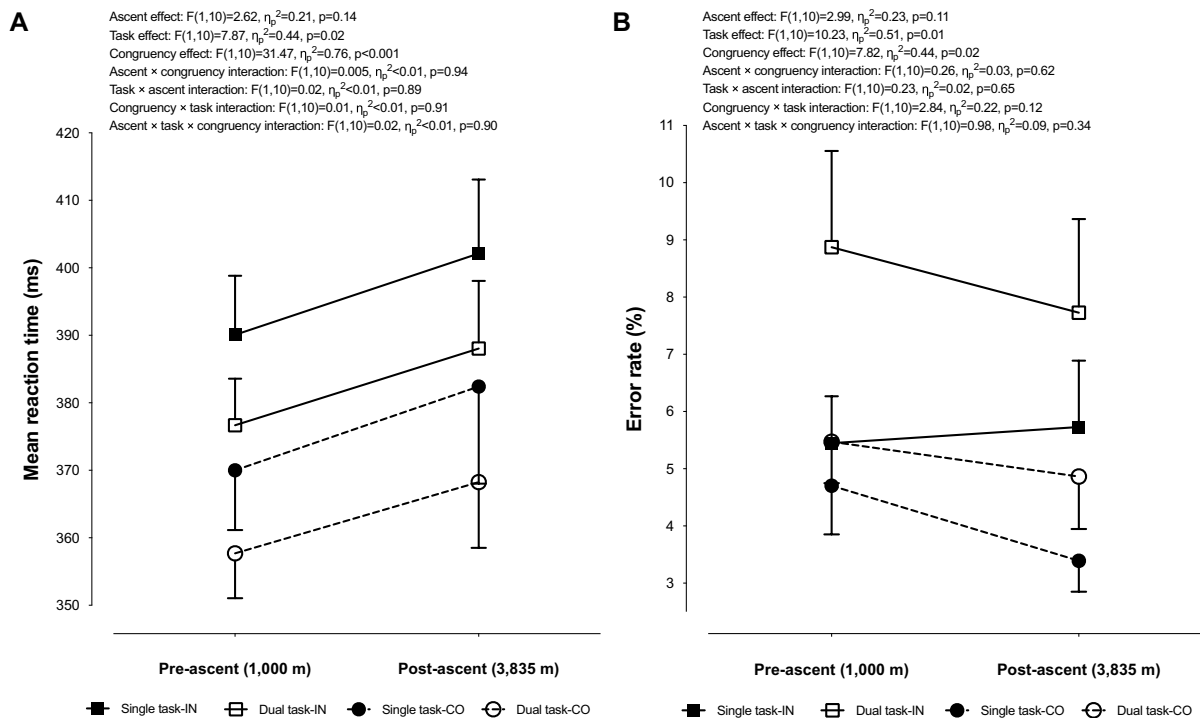
#### Accuracy

The speed ascent had no significant effect on the error rate at the Simon task. The error rate was higher in IN trials than in CO trials (+2.3  $\pm$  2.8%,  $p = 0.02$ ; Fig. 2B) and also higher in DT sessions than in ST sessions (+1.9  $\pm$  2.0%,  $p = 0.01$ ; Fig. 2B). No interaction term was highlighted.

#### Sensitivity analysis for the Simon task

Two-way (ascent  $\times$  congruency) ANOVA analysis conducted separately on the ST and DT sessions showed no significant effect of the ascent and no significant ascent  $\times$  congruency interaction, with a persistent significant effect of congruency on both reaction time and accuracy in both ST and DT sessions (Table S1, ESM2).

Sensitivity analysis considering the total ascent duration, the delay between the arrival at the Goûter hut and the post-ascent cognitive evaluations, the  $\text{SpO}_2$  level at the start of the post-ascent cognitive evaluations as well as the AMS cerebral score were also performed. There was no significant effect of these variables on the reaction time or on the accuracy during the cognitive task (Table S2, ESM2).



**Fig. 2** Pre-ascent (at 1000 m) and post-ascent (at 3835 m) mean reaction time (panel A) for congruent trials (CO, circle shape) and incongruent trials (IN, square shape) according to the single task (ST, full symbols) or the dual task (DT, empty symbols) setting. Error rate

(panel B) in pre-ascent and post-ascent conditions for congruent trials (CO, circle shape) and incongruent trials (IN, square shape) according to the single task (ST, full symbols) or the dual task (DT, empty symbols) setting (data represented as mean  $\pm$  SEM)

### Subject-reported outcomes

Mental fatigue reported by the subjects (Fig. 3A) increased through the cognitive task and to a greater extent during the post-ascent testing session. The difficulty to perform the cognitive task (Fig. 3B) increased after the DT session and was higher during the post-ascent testing session.

### Oxygenation and hemodynamic measurements

SpO<sub>2</sub> and HR values registered during the cognitive task, as well as prefrontal oxygenation parameters are reported in the Table 1 (ST sessions) and the Table 2 (DT sessions). MCAv, MCA DO<sub>2</sub> and TSI values are presented in Fig. 4.

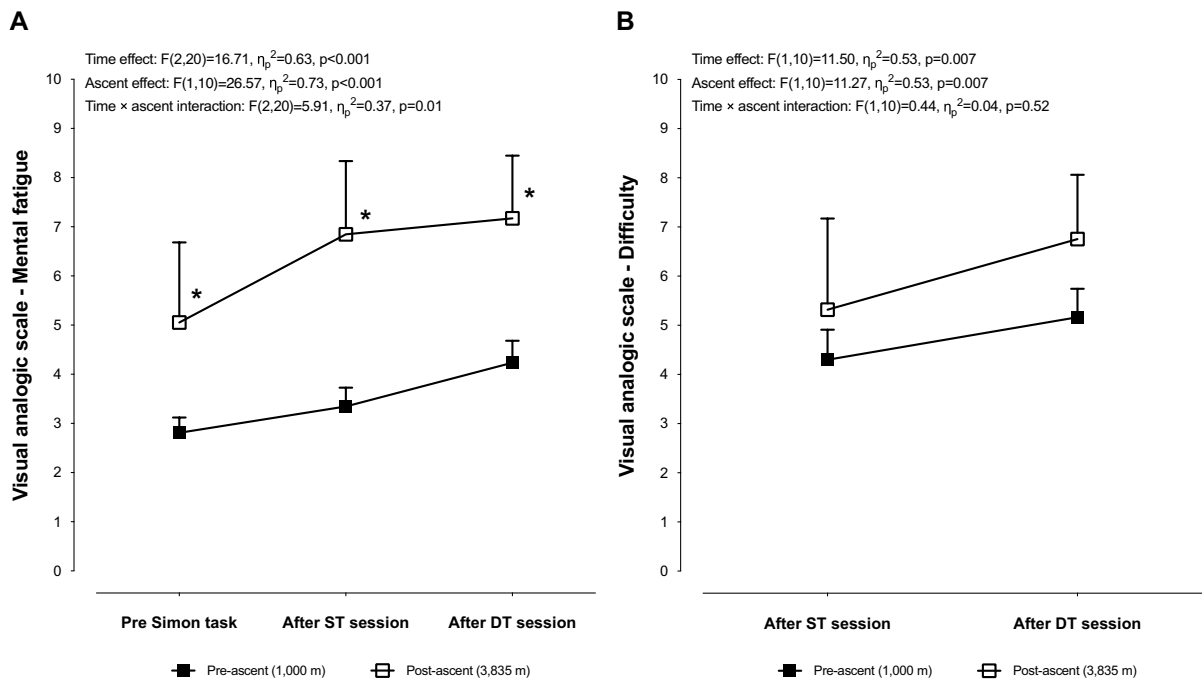
#### Oxygen saturation and heart rate

SpO<sub>2</sub> was lower during post-ascent evaluations at 3,815 m, both in ST and DT sessions (main ascent effect:  $p<0.001$ , Tables 1 and 2) and decreased significantly over the time in DT sessions in the post-ascent condition (main time effect:  $p<0.001$  and interaction time  $\times$  ascent:  $p<0.001$ , Table 2). Post-ascent, SpO<sub>2</sub> at ST-BL was significantly higher than

immediately after arrival at the Goûter hut (mean absolute difference:  $+9 \pm 5\%$ ,  $p<0.001$ ) and showed a trend to increase over the ST session (Table 1). HR significantly increased over time during the ST and DT sessions and was higher post-ascent, without any time  $\times$  ascent interaction, in either ST or DT sessions (Tables 1 and 2). Mean HR during the pre-ascent DT session was  $90 \pm 11$  bpm (corresponding to  $47 \pm 6\%$  of maximal HR) versus  $119 \pm 10$  bpm ( $62 \pm 5\%$  of maximal HR) during the post-ascent DT session ( $p<0.001$ ).

#### Cerebral hemodynamic

MCAv decreased over time during the ST test ( $p=0.006$ ; Fig. 4A) and followed a similar trend during the post-ascent test albeit from a lower starting point (mean relative difference after ascent:  $-9 \pm 16\%$ ,  $p=0.04$ ; Fig. 4A), without significant time  $\times$  ascent interaction. MCAv increased over time during the DT test ( $p<0.001$ ; Fig. 4B) but remained lower post-ascent compared to pre-ascent ( $p=0.04$ ; Fig. 4B), without significant time  $\times$  ascent interaction. MCA DO<sub>2</sub> responded similarly to MCAv during the ST session (Fig. 4C) at both altitudes. On another hand, during the DT session (Fig. 4D), the evolution of MCA DO<sub>2</sub> significantly



**Fig. 3** Self-assessment of mental fatigue (A) and difficulty to perform the Simon task (B) using a visual analogic scale (data represented as mean  $\pm$  SD). *ST* single task, *DT* dual task. \* $p < 0.05$  vs. pre-ascent at the same time

**Table 1** Heart rate, SpO<sub>2</sub> and changes in prefrontal oxygenation measured by functional near-infrared spectroscopy during the Simon task in the single-task session (at rest) in the pre- (altitude: 1000 m) and post-ascent (altitude: 3835 m) conditions

	ST-BL	4-min ST	8-min ST	Main time effect	Main ascent effect	Interaction time $\times$ ascent																																																																					
<b>SpO<sub>2</sub> (%)</b>																																																																											
Pre-ascent	100 $\pm$ 1	100 $\pm$ 1	100 $\pm$ 1	$F(1,11)=3.46$ $\eta_p^2=0.26$ $p=0.09$	$F(1,10)=85.91$ $\eta_p^2=0.90$ $p<0.001$	$F(1,11)=1.57$ $\eta_p^2=0.14$ $p=0.24$																																																																					
Post-ascent	87 $\pm$ 4	88 $\pm$ 5	88 $\pm$ 5				<b>Heart rate (bpm)</b>							Pre-ascent	67 $\pm$ 7	67 $\pm$ 6	68 $\pm$ 6	$F(2,20)=4.80$ $\eta_p^2=0.32$ $p=0.02$	$F(1,10)=152.51$ $\eta_p^2=0.94$ $p<0.001$	$F(2,20)=0.32$ $\eta_p^2=0.03$ $p=0.73$	Post-ascent	99 $\pm$ 7	97 $\pm$ 9	101 $\pm$ 7	<b><math>\Delta</math>HbO<sub>2</sub> (<math>\mu</math>M)</b>							Pre-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 1.6	1.3 $\pm$ 1.3	$F(2,20)=12.32$ $\eta_p^2=0.55$ $p<0.001$	$F(1,10)=0.60$ $\eta_p^2=0.06$ $p=0.46$	$F(1,13)=0.79$ $\eta_p^2=0.07$ $p=0.42$	Post-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	1.7 $\pm$ 1.2	1.4 $\pm$ 1.1	<b><math>\Delta</math>HHb (<math>\mu</math>M)</b>							Pre-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	- 0.7 $\pm$ 0.5	- 0.5 $\pm$ 0.6	$F(1,11)=7.76$ $\eta_p^2=0.44$ $p=0.02$	$F(1,10)=0.57$ $\eta_p^2=0.05$ $p=0.47$	$F(1,11)=1.20$ $\eta_p^2=0.11$ $p=0.30$	Post-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	- 0.8 $\pm$ 1.0	- 0.8 $\pm$ 1.3	<b><math>\Delta</math>HbTot (<math>\mu</math>M)</b>							Pre-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 1.5	0.7 $\pm$ 1.4	$F(2,20)=2.75$ $\eta_p^2=0.27$ $p=0.09$	$F(1,10)=0.00$ $\eta_p^2<0.01$ $p=0.98$	$F(1,11)=0.69$ $\eta_p^2=0.06$ $p=0.44$	Post-ascent
<b>Heart rate (bpm)</b>																																																																											
Pre-ascent	67 $\pm$ 7	67 $\pm$ 6	68 $\pm$ 6	$F(2,20)=4.80$ $\eta_p^2=0.32$ $p=0.02$	$F(1,10)=152.51$ $\eta_p^2=0.94$ $p<0.001$	$F(2,20)=0.32$ $\eta_p^2=0.03$ $p=0.73$																																																																					
Post-ascent	99 $\pm$ 7	97 $\pm$ 9	101 $\pm$ 7				<b><math>\Delta</math>HbO<sub>2</sub> (<math>\mu</math>M)</b>							Pre-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 1.6	1.3 $\pm$ 1.3	$F(2,20)=12.32$ $\eta_p^2=0.55$ $p<0.001$	$F(1,10)=0.60$ $\eta_p^2=0.06$ $p=0.46$	$F(1,13)=0.79$ $\eta_p^2=0.07$ $p=0.42$	Post-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	1.7 $\pm$ 1.2	1.4 $\pm$ 1.1	<b><math>\Delta</math>HHb (<math>\mu</math>M)</b>							Pre-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	- 0.7 $\pm$ 0.5	- 0.5 $\pm$ 0.6	$F(1,11)=7.76$ $\eta_p^2=0.44$ $p=0.02$	$F(1,10)=0.57$ $\eta_p^2=0.05$ $p=0.47$	$F(1,11)=1.20$ $\eta_p^2=0.11$ $p=0.30$	Post-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	- 0.8 $\pm$ 1.0	- 0.8 $\pm$ 1.3	<b><math>\Delta</math>HbTot (<math>\mu</math>M)</b>							Pre-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 1.5	0.7 $\pm$ 1.4	$F(2,20)=2.75$ $\eta_p^2=0.27$ $p=0.09$	$F(1,10)=0.00$ $\eta_p^2<0.01$ $p=0.98$	$F(1,11)=0.69$ $\eta_p^2=0.06$ $p=0.44$	Post-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 1.3	0.5 $\pm$ 1.8															
<b><math>\Delta</math>HbO<sub>2</sub> (<math>\mu</math>M)</b>																																																																											
Pre-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 1.6	1.3 $\pm$ 1.3	$F(2,20)=12.32$ $\eta_p^2=0.55$ $p<0.001$	$F(1,10)=0.60$ $\eta_p^2=0.06$ $p=0.46$	$F(1,13)=0.79$ $\eta_p^2=0.07$ $p=0.42$																																																																					
Post-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	1.7 $\pm$ 1.2	1.4 $\pm$ 1.1				<b><math>\Delta</math>HHb (<math>\mu</math>M)</b>							Pre-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	- 0.7 $\pm$ 0.5	- 0.5 $\pm$ 0.6	$F(1,11)=7.76$ $\eta_p^2=0.44$ $p=0.02$	$F(1,10)=0.57$ $\eta_p^2=0.05$ $p=0.47$	$F(1,11)=1.20$ $\eta_p^2=0.11$ $p=0.30$	Post-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	- 0.8 $\pm$ 1.0	- 0.8 $\pm$ 1.3	<b><math>\Delta</math>HbTot (<math>\mu</math>M)</b>							Pre-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 1.5	0.7 $\pm$ 1.4	$F(2,20)=2.75$ $\eta_p^2=0.27$ $p=0.09$	$F(1,10)=0.00$ $\eta_p^2<0.01$ $p=0.98$	$F(1,11)=0.69$ $\eta_p^2=0.06$ $p=0.44$	Post-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 1.3	0.5 $\pm$ 1.8																																	
<b><math>\Delta</math>HHb (<math>\mu</math>M)</b>																																																																											
Pre-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	- 0.7 $\pm$ 0.5	- 0.5 $\pm$ 0.6	$F(1,11)=7.76$ $\eta_p^2=0.44$ $p=0.02$	$F(1,10)=0.57$ $\eta_p^2=0.05$ $p=0.47$	$F(1,11)=1.20$ $\eta_p^2=0.11$ $p=0.30$																																																																					
Post-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	- 0.8 $\pm$ 1.0	- 0.8 $\pm$ 1.3				<b><math>\Delta</math>HbTot (<math>\mu</math>M)</b>							Pre-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 1.5	0.7 $\pm$ 1.4	$F(2,20)=2.75$ $\eta_p^2=0.27$ $p=0.09$	$F(1,10)=0.00$ $\eta_p^2<0.01$ $p=0.98$	$F(1,11)=0.69$ $\eta_p^2=0.06$ $p=0.44$	Post-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 1.3	0.5 $\pm$ 1.8																																																			
<b><math>\Delta</math>HbTot (<math>\mu</math>M)</b>																																																																											
Pre-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 1.5	0.7 $\pm$ 1.4	$F(2,20)=2.75$ $\eta_p^2=0.27$ $p=0.09$	$F(1,10)=0.00$ $\eta_p^2<0.01$ $p=0.98$	$F(1,11)=0.69$ $\eta_p^2=0.06$ $p=0.44$																																																																					
Post-ascent	0.0 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 1.3	0.5 $\pm$ 1.8																																																																								

Data are expressed as mean  $\pm$  SD

*ST-BL* single-task baseline, *ST* single task,  $\Delta$ HbO<sub>2</sub> absolute change in oxyhemoglobin from ST-BL,  $\Delta$ HHb absolute change in deoxyhemoglobin from ST-BL,  $\Delta$ HbTot absolute change in total hemoglobin from ST-BL

**Table 2** Heart rate, SpO<sub>2</sub> and changes in prefrontal oxygenation measured by functional near-infrared spectroscopy during the Simon task in the dual-task session (low-intensity cycling) in the pre- (altitude: 1000 m) and post-ascent (altitude: 3835 m) conditions

	DT-BL	DT end warm-up	4-min DT	8-min DT	Main time effect	Main ascent effect	Interaction time × ascent
SpO <sub>2</sub> (%)					F(2,16) = 16.74	F(1,10) = 280.63	F(3,30) = 14.28
Pre-ascent	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1	$\eta_p^2 = 0.62$	$\eta_p^2 = 0.97$	$\eta_p^2 = 0.59$
Post-ascent	88 ± 5*	82 ± 3*†	82 ± 4*†	81 ± 5*†	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
Heart rate (bpm)					F(1,14) = 56.20	F(1,10) = 53.58	F(2,15) = 0.79
Pre-ascent	66 ± 8	87 ± 10	89 ± 12	92 ± 12	$\eta_p^2 = 0.85$	$\eta_p^2 = 0.84$	$\eta_p^2 = 0.07$
Post-ascent	93 ± 10	111 ± 15	118 ± 11	116 ± 14	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p = 0.44$
ΔHbO <sub>2</sub> (μM)					F(3,30) = 12.37	F(1,10) = 14.57	F(3,30) = 6.23
Pre-ascent	0.0 ± 0.0	-0.7 ± 1.1	0.7 ± 1.7‡	1.4 ± 1.3‡‡	$\eta_p^2 = 0.55$	$\eta_p^2 = 0.59$	$\eta_p^2 = 0.38$
Post-ascent	0.0 ± 0.0	-2.0 ± 1.6*†	-0.9 ± 1.5*	-0.2 ± 1.8*‡	$p < 0.001$	$p = 0.003$	$p = 0.002$
ΔHHb (μM)					F(3,30) = 14.66	F(1,10) = 11.14	F(1,12) = 12.32
Pre-ascent	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.6	-0.1 ± 0.7‡	-0.1 ± 0.7‡	$\eta_p^2 = 0.59$	$\eta_p^2 = 0.53$	$\eta_p^2 = 0.55$
Post-ascent	0.0 ± 0.0	1.7 ± 1.5*†	2.0 ± 1.50*†	2.5 ± 2.0*†	$p < 0.001$	$p = 0.008$	$p = 0.003$
ΔHbTot (μM)					F(2,17) = 15.36	F(1,10) = 0.95	F(3,30) = 2.08
Pre-ascent	0.0 ± 0.0	-0.3 ± 1.3	0.6 ± 2.0	1.4 ± 1.6	$\eta_p^2 = 0.60$	$\eta_p^2 = 0.09$	$\eta_p^2 = 0.17$
Post-ascent	0.0 ± 0.0	-0.3 ± 1.2	1.0 ± 1.4	2.3 ± 1.4	$p < 0.001$	$p = 0.35$	$p = 0.12$

Data are expressed as mean ± SD

DT-BL dual-task baseline, DT dual task, ΔHbO<sub>2</sub> absolute change in oxyhemoglobin from DT-BL, ΔHHb absolute change in deoxyhemoglobin from DT-BL, ΔHbTot absolute change in total hemoglobin from DT-BL

\* $p < 0.05$  vs. pre-ascent value; † $p < 0.05$  vs. DT-BL value; ‡ $p < 0.05$  vs. DT end warm-up value

differed between the two altitudes: compared to BL, MCA DO<sub>2</sub> increased with low-intensity cycling, and then remained higher than at BL during all the cognitive assessments pre-ascent, whereas post-ascent, MCA DO<sub>2</sub> remained stable during all the sessions, and significantly lower compared to pre-ascent.

### Cerebral oxygenation

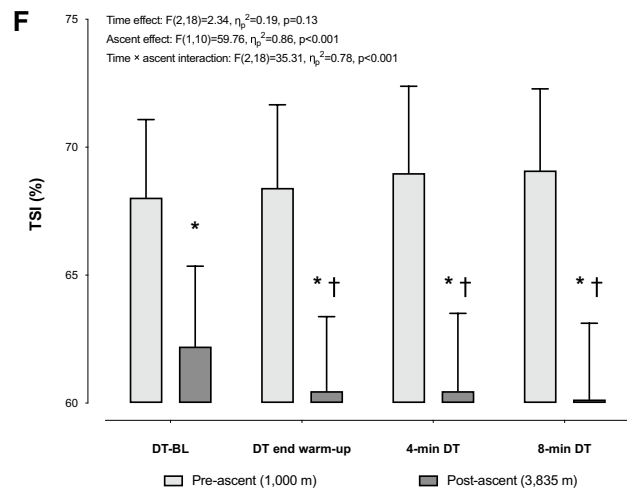
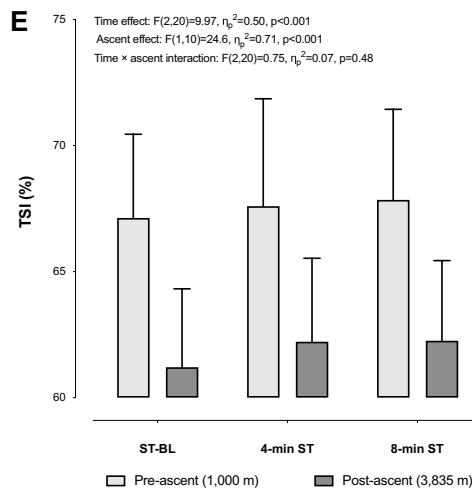
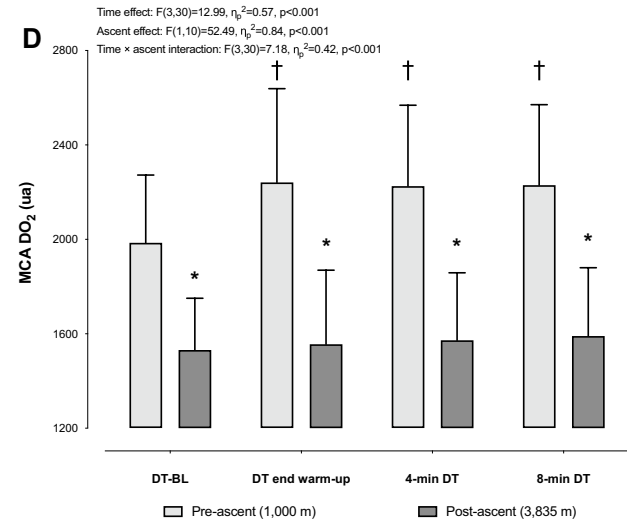
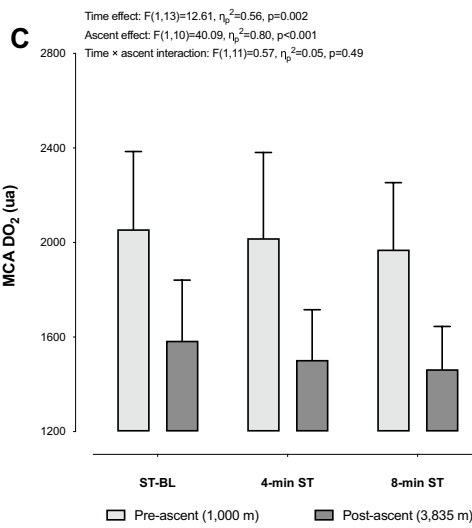
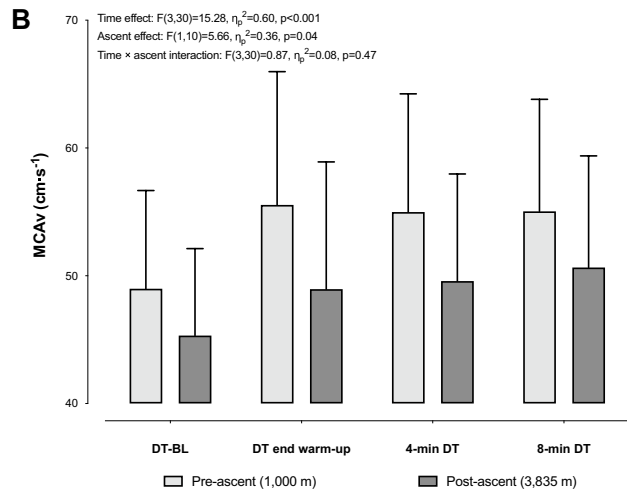
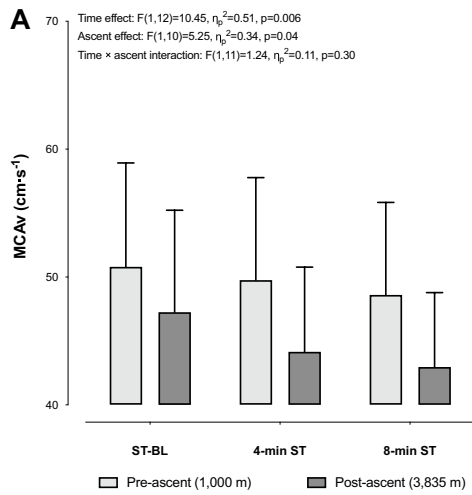
In ST and DT sessions, prefrontal TSI was significantly lower post-ascent than pre-ascent (Fig. 4E, F). In ST sessions, TSI increased during the cognitive task ( $p < 0.001$ ; Fig. 4E) without significant time × ascent interaction. During the post-ascent DT tests, TSI was significantly lower than during the pre-ascent tests at all points and significantly decreased throughout the duration of the test whereas it remained stable pre-ascent (Fig. 4F).

Prefrontal [HbO<sub>2</sub>] increased and [HHb] decreased over time during the ST tests (main time effect:  $p < 0.05$  for all variables; Table 1) while there was a trend for an increase in [HbTot] during the same time period (Table 1). The ascent had no significant effect on prefrontal [HbO<sub>2</sub>], [HHb] and [HbTot] during ST. A significant interaction time × ascent was observed for [HbO<sub>2</sub>] and [HHb] but not for [HbTot] (Table 2) during the DT. Pre-ascent, [HbO<sub>2</sub>] increased and [HHb] decreased in response to the cognitive task during cycling. Post-ascent, a similar increase

in [HbO<sub>2</sub>] was observed while [HHb] also tended to increase in response to the cognitive task during cycling. The increase in [HbTot] in response to the cognitive task during cycling did not differ between pre- and post-ascent.

### Discussion

Using an original field study design, we evaluated the reactivity as well as the cognitive control (i.e., the ability to resist prepotent but inappropriate responses) of elite climbers after a speed ascent to high altitude. Contrary to our original hypothesis and despite the perceived mental fatigue and difficulty to perform the cognitive task, neither reaction time nor accuracy were altered. The magnitude of the Simon effect was also similar between pre- and post-ascent tests, suggesting a preserved cognitive control after a strenuous exercise in hypoxia. These data suggest that cognitive control is a robust cognitive process unaltered in extreme conditions in trained and partially acclimatized subjects.



**Fig. 4** Middle cerebral artery mean velocity (MCAv) changes during the cognitive assessment in the single-task session (A) and dual-task session (B) of the Simon task, in pre-ascent and post-ascent conditions. Estimated MCA O<sub>2</sub> delivery (MCA DO<sub>2</sub>) changes in the single-task session (C) and dual-task session (D) of the Simon task, in pre-ascent and post-ascent conditions. Tissue saturation index (TSI) of the prefrontal cortex changes in the single-task session (E) and dual-task session (F) of the Simon task, in pre-ascent and post-ascent conditions (data represented as mean ± SD). *ST* single task, *DT* dual task, *BL* baseline. \**p* < 0.05 vs. pre-ascent value at the same time; †*p* < 0.05 vs. BL value at the same altitude

### The cognitive response to a speed ascent in high altitude

Our findings on reaction time and accuracy were in accordance with previous studies (Ando et al. 2013; Komiyama et al. 2015, 2017) performed in normobaric hypoxia at lower (1300–2600 m) or similar (3800–4500 m) simulated altitudes during cycling at moderate intensity using a Go/No-Go task that also evaluates inhibitory control (Diamond 2013). Moreover, cognitive control had been previously shown to be preserved after acute passive exposure to high altitude at 4350 m (Davranche et al. 2016), sleep deprivation (Temesi et al. 2013) or high-intensity exercise (Davranche et al. 2015). Preserved cognitive performances were observed post-ascent in the present study despite the duration of the effort performed by the climbers (mean duration of 9 h), at relatively high intensity (half of the ascent duration was above 80% of maximal HR) and under severe hypoxic conditions (as highlighted by the SpO<sub>2</sub> values during the ascent). In trained individuals, the effect of high-intensity exercise on cognition remains mostly unexplored, especially when considering executive functions (Browne et al. 2017). Also, the cognitive impact of prolonged and sustained exercise in hypoxia has never been explored either in the field or in laboratory setting (Ando et al. 2020). As suggested by Ando et al. (2020), climbers who are trained to exercising at altitude may develop specific adaptations allowing them to preserve their cognitive performances in these extreme conditions. Nevertheless, the cognitive abilities (i.e., reaction time, inhibitory control) evaluated in the present study represent only one aspect of the whole array of cognitive skills and the impact of a speed ascent on other cognitive processes (that could be less robust to hypoxia and/or exercise) remains to be investigated. In particular, a specific impact of hypoxia on executive or non-executive tasks is still debated (Ando et al. 2020).

It should be emphasized that under the present field study design several factors could contribute to a change in cognitive responses. For instance, prolonged and sustained exertion, hypoxic exposure throughout the ascent (as well as during the cognitive evaluations), sleep deprivation the night before the ascent and the cold exposure during climbing or

AMS, all are factors that may impair aspects of cognitive function (Temesi et al. 2013; Taylor et al. 2016; Issa et al. 2016; Davranche et al. 2016). Nevertheless, because we showed no cognitive impairment between the two conditions (pre- vs. post-ascent), the present results further underline the robustness of cognitive control in these climbers. As opposed to previous laboratory studies (Ando et al. 2013; Komiyama et al. 2015, 2017; Lefferts et al. 2016), the cognitive assessment was performed some time after the end of the physical exertion in hypoxia (i.e. within 1 h after the end of the speed ascent when reaching Goûter hut) and not during the fatiguing exercise itself; it can, therefore, not be excluded that cognitive performances could have been affected if tested during the ascent (i.e. during intense physical exertion in severe hypoxia). Although the delay between the arrival in Goûter hut and the post-ascent evaluation may have induced some recovery, sensitivity analyses considering this time delay and the SpO<sub>2</sub> at the beginning of the cognitive evaluations (ST-BL) did not highlight any difference on reaction time or accuracy. Furthermore, an effect of exercise on cognitive performance has been shown to persist at least until 50 min post-exercise (Joyce et al. 2009), suggesting that our cognitive assessment delay was compatible with the observation of the effects of the ascent.

We observed a faster reaction time in the DT sessions than in ST sessions, which was consistent between pre- and post-ascent in the absence of ascent interaction. This result may seem unexpected when considering the cognitive-motor DT interference paradigm (Leone et al. 2017) and previous results (Hamacher et al. 2017). However, it may also reflect a beneficial cognitive arousal effect of exercise, mostly described during moderate-intensity exercise (Lambourne and Tomporowski 2010; McMorris and Hale 2012) and previously shown to be preserved in hypoxia (Ando et al. 2013; Komiyama et al. 2015). This improvement in reaction time during a DT involving low-intensity cycling is in accordance with similar results observed in normoxia during low-intensity cycling at 20% of maximal aerobic power (~50 W; (Davranche and Audiffren 2004)). Interestingly, this study and ours have in common to involve athletes expert in decision-making sports, suggesting that athletes used to taking decisions during physical activity may have a lower arousal exercise threshold than the general population.

### The cerebral response during the cognitive assessment

To add a more mechanistic approach to our study of the cognitive performance, we focused on the potential cerebral hemodynamic and oxygenation alterations that could have underpinned the alterations in cognitive function. As expected, the post-ascent condition was globally characterized by a decrease in SpO<sub>2</sub> and thus in MCA DO<sub>2</sub>

and subsequently lower absolute TSI values, reflecting an impaired PFC oxygenation due to a high-altitude exposure (Ando et al. 2013; Komiyama et al. 2015). Interestingly, different hemodynamic and PFC oxygenation patterns were observed whether the cognitive task was performed at rest (ST) or during exercise (DT).

### ST session

During the ST session, the lower values of MCAv post-ascent as well as its reduction over the time may appear surprising. Following an acute exposure to hypoxia, an increase in cerebral blood flow (CBF) is usually described, mainly induced by a hypoxia-mediated cerebral vasodilatation (Brugniaux et al. 2007; Verges et al. 2012), in turns allowing to preserve oxygen delivery despite a reduced arterial oxygen content (Brugniaux et al. 2007). Conversely, hypoxemia is also well-known to induce hyperventilation through a respiratory chemoreflex, leading to hypocapnia, which induces cerebral vasoconstriction potentially counterbalancing the cerebral hypoxic-vasodilatory effect; the net changes in CBF being the result of the balance between vasodilation and vasoconstriction (Brugniaux et al. 2007). Hence, if an increase in MCAv has been reported after acute hypoxic exposure (Imray et al. 2014; Lefferts et al. 2016), no change or even a decrease in MCAv has also been observed (Ainslie et al. 2007; De Bels et al. 2019; Lefferts et al. 2020). Hypoxia-induced cerebral vasodilatation may occur below a SpO<sub>2</sub> threshold of 90% (Verges et al. 2012) and is more pronounced when SpO<sub>2</sub> is lower than 80% (Hoiland et al. 2016), a level which is lower than the SpO<sub>2</sub> measured at BL-ST during the post-ascent cognitive task at 3835 m. We can, therefore, postulate that the post-ascent reduction in MCAv was mediated by a predominant vasoconstrictive effect of hypocapnia-related hypoxia-induced hyperventilation. Furthermore, the sustained exertion during the ascent could exacerbate the reduction post-ascent MCAv. Indeed, a recent study demonstrated that cerebrovascular reactivity (especially vasodilation response to hypercapnia) is impaired during the first hours of recovery period after a high-intensity exercise (Burma et al. 2020) and the authors suggested that a prolonged alteration of the cerebral vessel's tone (remaining constricted) could be triggered by the exercise-induced hyperventilation. Unfortunately, end-tidal partial pressure of carbon dioxide was not monitored in the present study. Similarly, the continuous MCAv decrease during the ST session could reflect a moderate hyperventilation triggered by the cognitive task (Lefferts et al. 2020). However, this modest (~10%), albeit significant decrease in MCAv (and in turn in MCA DO<sub>2</sub>) between the pre- and post-ascent cognitive assessment is not incompatible with the maintenance of cognitive capacity. Indeed, a recent study showed that a ~30% decrease in CBF (estimated through

MCAv measurement) only induced a slight (~7%) decrease in cerebral performances (Shoemaker et al. 2021). During ST, a typical PFC activation response to a cognitive task was observed, including a rise in [HbO<sub>2</sub>] and a decrease in [HHb], as previously shown (Davranche et al. 2016). This pattern was similar pre- and post-ascent, suggesting that the regional neurovascular coupling was preserved at high altitude despite the heavy exertion in hypoxia during the ascent.

### DT sessions

Interestingly, a different cerebral hemodynamic and oxygenation pattern was observed during the DT session both during the pre- and post-ascent tests. Pre-ascent, PFC oxygenation was not affected by the 3-min cycling warm-up, which is in line with a previous report on low-intensity exercise (Rupp et al. 2008). On the contrary, post-ascent, the 3-min cycling warm-up led to a significant drop in SpO<sub>2</sub> as well as a reduction in [HbO<sub>2</sub>] and an increase in [HHb] (Table 2), in accordance with previous observations (Subudhi et al. 1985). This deoxygenation pattern was not counterbalanced by the increase in MCAv (Fig. 4B) as reflected by the unchanged MCA DO<sub>2</sub> from rest to exercise post-ascent as opposed to pre-ascent (Fig. 4D). Consequently, TSI was significantly reduced from rest to exercise post-ascent (Fig. 4F) as previously shown (Lefferts et al. 2016). This led to a likely reduction in oxygen availability at the start of the cognitive task in DT post-ascent compared to pre-ascent. Taken together, these responses led to a typical and expected activation response due to the Simon task during the pre-ascent tests, while, post-ascent, [HbO<sub>2</sub>] remained similar to the baseline value despite a rise in PFC throughout the DT Simon task. Concomitantly, [HHb] showed a tendency to increase, suggesting an increase in oxygen extraction possibly contributing to the preservation of cognitive performance post-ascent despite reduced oxygen delivery.

Finally, it should be emphasized that MCAv and PFC oxygenation changes are complementary observations and can show distinct responses because of differences between brain regions as well as between distal and proximal vessels (Lefferts et al. 2016). For instance, the reduction in MCAv observed during the ST sessions could also be due to a redistribution of CBF towards the anterior cerebral artery (that mainly supply the PFC) and the posterior artery (visual processing task), secondary to the PFC activation during the cognitive task.

### Study limitations

Our study is not exempt from the common methodological limitations associated with the use of TCD for the measure of brain blood flow velocity. Indeed, there has been suggestions that caution should be applied when using this

technique in hypoxia, since hypoxia itself as well the associated changes in ventilation and in turn in arterial partial pressure in CO<sub>2</sub>, could influence the diameter of the MCA (Ainslie and Hoiland 2014). However, to which extend these changes apply to the M1 segment of the MCA, which is insonated with TCD still remains debated (Brothers and Zhang 2016). Otherwise, due to logistical constraints associated with this type of field study, we were not able to perform control measurements to determine the effect of acute high-altitude exposure or long-duration exertion per se, that would have allowed us to detangle the respective effects of the hypoxic exposure and physical effort, respectively. The relatively small sample size of our study may have limited the statistical power of the analysis. Nevertheless, these participants constituted a homogenous group of elite climbers and corresponded to the entire French national high-altitude climbing team. Furthermore, sensitivity cognitive analyses conducted to deal with this methodological limitation ultimately reinforced the conclusions as they were concordant with the primary analysis. We believe that speed climbing represents an original and unique model, as such intensive exercise with a gradual hypoxic condition seems difficult to replicate in laboratory. We are aware that this population of elite climbers is not representative of the general population of mountaineers or non-acclimatized climbers and therefore, results of the present study cannot be extrapolated to all high-altitude climbing situations. Similarly, these results cannot be extrapolated to other dimensions of cognitive abilities that may be differently impacted by a speed ascent to high altitude.

## Conclusion

Despite a strenuous and prolonged exercise under severe hypoxic conditions at high-altitude, cognitive control was preserved in elite climbers after a speed ascent to the top of the Mont-Blanc. These athletes seem to tolerate the reduced cerebral oxygenation and long-duration exercise-induced fatigue which might help them to cope with their unstable and hazardous environment.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00421-021-04855-6>.

**Acknowledgements** We thank the elite climbers from the FFCAM and their coaches for their enthusiastic participation, as well as the staff of the Gôûter hut for technical assistance, Julia Roger-Veyer (RN) for expert technical assistance and the Centre national de la recherche scientifique (CNRS) délégation Alpes for the provision of the Vallot Observatory. We thank Thibault Le Roux-Mallouf for his fNIRS technical help. Two elite climbers from the Groupe Excellence National Alpinisme (GEAN), who participated in the study, accidentally passed away during the first ascent of the West face of the Mingbo Eiger (6070

m) in Nepal, during collation of this manuscript. The authors express their sincere condolences to the climbers' families and friends.

**Author contributions** BC, KD, JVB, SB, SD, PR, PB and SV designed the study. BC, JVB, SB, SD, PR, PB and SV acquired the data. BC, KD and TG performed the statistical analysis. BC, KD, JVB, SB and SV analyzed and interpreted the data. BC, KD, JVB and SV wrote the manuscript. SB, TG, SD, PR and PB revised it for important intellectual content. All authors gave final approval and agreed to be accountable for all aspects of work ensuring integrity and accuracy.

**Funding** This study was supported by a grant from the FFCAM (*Fédération Française des Clubs Alpins et de Montagne*). However, the sponsors had no further involvement in any step of the project.

**Data availability** The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Code availability** Not applicable.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors have no conflicts of interest to declare that are relevant to the content of this article.

**Ethics approval** This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the French Ethics Committee CPP Ouest VI (approval reference number 2019-A01866-51).

**Consent to participate** Written informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

**Consent to publication** The authors affirm that human research participants provided informed consent for publication.

## References

- Ainslie PN, Hoiland RL (2014) Transcranial Doppler ultrasound: valid, invalid, or both? *J Appl Physiol* 117:1081–1083. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00854.2014>
- Ainslie PN, Barach A, Murrell C et al (2007) Alterations in cerebral autoregulation and cerebral blood flow velocity during acute hypoxia: rest and exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H976–H983. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00639.2006>
- Algaze I, Phillips L, Inglis P et al (2020) Incidence of mild cognitive impairment with ascending altitude. *High Alt Med Biol* 21:184–191. <https://doi.org/10.1089/ham.2019.0111>
- Ando S, Hatamoto Y, Sudo M et al (2013) The effects of exercise under hypoxia on cognitive function. *PLoS ONE* 8:e63630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063630>
- Ando S, Komiyama T, Sudo M et al (2020) The interactive effects of acute exercise and hypoxia on cognitive performance: a narrative review. *Scand J Med Sci Sports* 30:384–398. <https://doi.org/10.1111/sms.13573>
- Bouzat P, Séchaud G, Banco P et al (2018) The effect of zolpidem on cognitive function and postural control at high altitude. *Sleep*. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsy153>
- Brothers RM, Zhang R (2016) CrossTalk opposing view: the middle cerebral artery diameter does not change during alterations

- in arterial blood gases and blood pressure: CrossTalk. *J Physiol* 594:4077–4079. <https://doi.org/10.1113/JP271884>
- Browne SE, Flynn MJ, O'Neill BV, et al (2017) Effects of acute high-intensity exercise on cognitive performance in trained individuals: a systematic review. In: *Progress in brain research*. Elsevier, pp 161–187
- Brugniaux JV, Hodges ANH, Hanly PJ, Poulin MJ (2007) Cerebrovascular responses to altitude. *Respir Physiol Neurobiol* 158:212–223. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2007.04.008>
- Burma JS, Macaulay A, Copeland P et al (2020) Comparison of cerebrovascular reactivity recovery following high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training. *Physiol Rep* 8:e14467. <https://doi.org/10.14814/phy2.14467>
- Davranche K, Audiffren M (2004) Facilitating effects of exercise on information processing. *J Sports Sci* 22:419–428. <https://doi.org/10.1080/02640140410001675289>
- Davranche K, McMorris T (2009) Specific effects of acute moderate exercise on cognitive control. *Brain Cogn* 69:565–570. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2008.12.001>
- Davranche K, Brisswalter J, Radel R (2015) Where are the limits of the effects of exercise intensity on cognitive control? *J Sport Health Sci* 4:56–63. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2014.08.004>
- Davranche K, Casini L, Arnal PJ et al (2016) Cognitive functions and cerebral oxygenation changes during acute and prolonged hypoxic exposure. *Physiol Behav* 164:189–197. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.06.001>
- De Bels D, Pierrakos C, Bruneteau A et al (2019) Variation of cognitive function during a short stay at hypobaric hypoxia chamber (Altitude: 3842 M). *Front Physiol* 10:806. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00806>
- Diamond A (2013) Executive functions. *Annu Rev Psychol* 64:135–168. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-113011-143750>
- Hamacher D, Brennicke M, Behrendt T et al (2017) Motor-cognitive dual-tasking under hypoxia. *Exp Brain Res* 235:2997–3001. <https://doi.org/10.1007/s00221-017-5036-y>
- Hoiland RL, Bain AR, Rieger MG et al (2016) Hypoxemia, oxygen content, and the regulation of cerebral blood flow. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 310:R398–R413. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00270.2015>
- Imray C, Chan C, Stubbings A et al (2014) Time course variations in the mechanisms by which cerebral oxygen delivery is maintained on exposure to hypoxia/altitude. *High Alt Med Biol* 15:21–27. <https://doi.org/10.1089/ham.2013.1079>
- Issa AN, Herman NM, Wentz RJ et al (2016) Association of cognitive performance with time at altitude, sleep quality, and acute mountain sickness symptoms. *Wilderness Environ Med* 27:371–378. <https://doi.org/10.1016/j.wem.2016.04.008>
- Joyce J, Graydon J, McMorris T, Davranche K (2009) The time course effect of moderate intensity exercise on response execution and response inhibition. *Brain Cogn* 71:14–19. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2009.03.004>
- Komiyama T, Sudo M, Higaki Y et al (2015) Does moderate hypoxia alter working memory and executive function during prolonged exercise? *Physiol Behav* 139:290–296. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.11.057>
- Komiyama T, Katayama K, Sudo M et al (2017) Cognitive function during exercise under severe hypoxia. *Sci Rep* 7:10000. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10332-y>
- Lambourne K, Tomporowski P (2010) The effect of exercise-induced arousal on cognitive task performance: a meta-regression analysis. *Brain Res* 1341:12–24. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.091>
- Lefferts WK, Babcock MC, Tiss MJ et al (2016) Effect of hypoxia on cerebrovascular and cognitive function during moderate intensity exercise. *Physiol Behav* 165:108–118. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.07.003>
- Lefferts WK, DeBlois JP, Soriano JE et al (2020) Preservation of neurovascular coupling to cognitive activity in anterior cerebrovasculature during incremental ascent to high altitude. *High Alt Med Biol* 21:20–27. <https://doi.org/10.1089/ham.2019.0050>
- Leone C, Feys P, Moumdjian L et al (2017) Cognitive-motor dual-task interference: a systematic review of neural correlates. *Neurosci Biobehav Rev* 75:348–360. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.01.010>
- Limmer M, Platen P (2018) The influence of hypoxia and prolonged exercise on attentional performance at high and extreme altitudes: a pilot study. *PLoS ONE* 13:e0205285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205285>
- Lu C, Proctor RW (1995) The influence of irrelevant location information on performance: a review of the Simon and spatial Stroop effects. *Psychon Bull Rev* 2:174–207. <https://doi.org/10.3758/BF03210959>
- McMorris T, Hale BJ (2012) Differential effects of differing intensities of acute exercise on speed and accuracy of cognition: a meta-analytical investigation. *Brain Cogn* 80:338–351. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2012.09.001>
- McMorris T, Hale BJ, Barwood M et al (2017) Effect of acute hypoxia on cognition: a systematic review and meta-regression analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 74:225–232. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.01.019>
- Miller EK, Cohen JD (2001) An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci* 24:167–202. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.167>
- Ochi G, Yamada Y, Hyodo K et al (2018) Neural basis for reduced executive performance with hypoxic exercise. *Neuroimage* 171:75–83. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.12.091>
- Puthon L, Bouzat P, Rupp T et al (2016) Physiological characteristics of elite high-altitude climbers: climbers in hypoxia. *Scand J Med Sci Sports* 26:1052–1059. <https://doi.org/10.1111/sms.12547>
- Roach RC, Hackett PH, Oelz O et al (2018) The 2018 Lake Louise acute mountain sickness score. *High Alt Med Biol* 19:4–6. <https://doi.org/10.1089/ham.2017.0164>
- Rupp T, Thomas R, Perrey S, Stephane P (2008) Prefrontal cortex oxygenation and neuromuscular responses to exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol* 102:153–163. <https://doi.org/10.1007/s00421-007-0568-7>
- Sampson JB, Cymerman A, Burse RL et al (1983) Procedures for the measurement of acute mountain sickness. *Aviat Space Environ Med* 54:1063–1073
- Shoemaker LN, Wilson LC, Lucas SJE et al (2021) Indomethacin markedly blunts cerebral perfusion and reactivity, with little cognitive consequence in healthy young and older adults. *J Physiol* 599:1097–1113. <https://doi.org/10.1113/JP280118>
- Simon JR (1990) The effects of an irrelevant directional CUE on human information processing. In: *Advances in psychology*. Elsevier, pp 31–86
- Subudhi AW, Miramon BR, Granger ME (1985) Roach RC (2009) Frontal and motor cortex oxygenation during maximal exercise in normoxia and hypoxia. *J Appl Physiol Bethesda Md* 106:1153–1158. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91475.2008>
- Taylor L, Watkins SL, Marshall H et al (2016) The impact of different environmental conditions on cognitive function: a focused review. *Front Physiol*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00372>
- Temesi J, Arnal PJ, Davranche K et al (2013) Does central fatigue explain reduced cycling after complete sleep deprivation? *Med Sci Sports Exerc* 45:2243–2253. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31829ce379>
- Verges S, Rupp T, Jubeau M et al (2012) Cerebral perturbations during exercise in hypoxia. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 302:R903–R916. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00555.2011>

- Wickens CD, Keller JW, Shaw C (2015) Human factors in high-altitude mountaineering. *J Hum Perform Extreme Environ*. <https://doi.org/10.7771/2327-2937.1065>
- Willie CK, Colino FL, Bailey DM et al (2011) Utility of transcranial Doppler ultrasound for the integrative assessment of cerebrovascular function. *J Neurosci Methods* 196:221–237. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.01.011>
- Wilson MH, Newman S, Imray CH (2009) The cerebral effects of ascent to high altitudes. *Lancet Neurol* 8:175–191. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70014-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70014-6)

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



# Changes in cardiac function following a speed ascent to the top of Europe at 4808 m

Benoit Champigneulle<sup>1</sup> · Stéphane Doutreleau<sup>1</sup> · Sébastien Baillieu<sup>1</sup> · Julien Vincent Brugniaux<sup>1</sup> · Paul Robach<sup>1,2</sup> · Pierre Bouzat<sup>3</sup> · Samuel Verges<sup>1</sup>

Received: 14 October 2021 / Accepted: 18 January 2022  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

## Abstract

**Purpose** Both prolonged exercise and acute high-altitude exposure are known to induce cardiac changes. We sought to describe the cardiac responses to speed climbing at high-altitude, including left ventricular (LV) performance assessment using the myocardial work index (MWI), a new index derived from 2D speckle tracking echocardiography (STE).

**Methods** Eleven elite alpinists (9 males, age:  $26 \pm 4$  years) were evaluated before and immediately after a speed ascent of the Mont-Blanc (4808 m) by echocardiography using conventional measurements as well as STE and MWI computation with derivate parameters as global work efficiency (GWE) or global wasted work (GWW).

**Results** Athletes performed a long-duration (8 h 58 min  $\pm$  60 min) and intense ( $78 \pm 4\%$  of maximal heart rate) ascent under gradual hypoxic conditions (minimal SpO<sub>2</sub> at 4808 m:  $71 \pm 4\%$ ). Hypoxic exercise-induced cardiac fatigue was observed post-ascent with a change in right ventricular (RV) and LV systolic function (RV fractional area change:  $-20 \pm 23\%$ ,  $p=0.01$ ; LV global longitudinal strain change:  $-8 \pm 9\%$ ,  $p=0.02$ ), as well as LV geometry and RV–LV interaction alterations with emergence of a D-shape septum in 5/11 (46%) participants associated with RV pressure overload (mean pulmonary arterial pressure change:  $+55 \pm 20\%$ ,  $p<0.001$ ). Both MWI and GWE were reduced post-ascent ( $-21 \pm 16\%$ ,  $p=0.004$  and  $-4 \pm 4\%$ ,  $p=0.007$ , respectively). Relative decrease in MWI and GWE were inversely correlated with increase in GWW ( $r=-0.86$ ,  $p=0.003$  and  $r=-0.97$ ,  $p<0.001$ , respectively).

**Conclusions** Prolonged high-altitude speed climbing in elite climbers is associated with RV and LV function changes with a major interaction alteration. MWI, assessing the myocardial performance, could be a new tool for evaluating LV exercise-induced cardiac fatigue.

**Keywords** Altitude · Exercise · Cardiac fatigue · Myocardial work index · 2D speckle tracking echocardiography

---

Communicated by Massimo Pagani.

---

Benoit Champigneulle and Stéphane Doutreleau share first authorship.

---

Pierre Bouzat and Samuel Verges share senior authorship.

---

✉ Benoit Champigneulle  
BChampigneulle@chu-grenoble.fr

<sup>1</sup> HP2 laboratory, UM Sports Pathologies, Hôpital Sud, Univ. Grenoble Alpes, Inserm, CHU Grenoble Alpes, CS 10217, 38043 Cedex 9 Grenoble, France

<sup>2</sup> National School for Mountain Sports, Site of the National School for Skiing and Mountaineering (ENSA), Chamonix, France

<sup>3</sup> Univ. Grenoble Alpes, Inserm, U1216, CHU Grenoble Alpes, Grenoble Institut Neurosciences, Grenoble, France

## Abbreviations

ABP	Arterial blood pressure
AMS	Acute mountain sickness
ANOVA	Analysis of variance
BM	Body mass
GCW	Global constructive work
GLS	Global longitudinal strain
GWE	Global work efficiency
GWW	Global wasted work
[Hb]	Hemoglobin concentration
Hct	Hematocrit
HR	Heart rate
HR <sub>max</sub>	Maximal heart rate
LV	Left ventricle
LVED	Left ventricle end-diastolic
LVEF	Left ventricle ejection fraction
LVEI	Left ventricle end-systolic eccentricity index

LLQ	Lake Louise questionnaire
mPAP	Mean pulmonary artery pressure
MWI	Myocardial work index
PEH	Postexercise hypotension
PV	Plasma volume
RPE	Rating of perceived exertion
RV	Right ventricle
RV FAC	Right ventricle fractional area change
SD	Standard deviation
SV	Stroke volume
sPAP	Systolic pulmonary artery pressure
SpO <sub>2</sub>	Pulse oxygen saturation
STE	Speckle tracking echocardiography
TTE	Transthoracic echocardiography
$\dot{V}O_{2peak}$	Peak oxygen uptake

## Introduction

Exercise at altitude as performed during ski mountaineering (Duc et al. 2011), alpine-cycling (Neumayr 2004), mountain ultramarathon (Fornasiero et al. 2018) or mountaineering (Billat et al. 2010) represents a physiological challenge for the human organism. Over the past years, speed ascent emerged as a new extreme mountaineering activity among elite mountaineers, consisting in reaching summits from the bottom as fast as possible and being associated with prolonged strenuous exercise under hypoxic conditions (Millet and Jornet 2019). The physiological impact of this new mountaineering activity remains uninvestigated while it could represent a unique model of combined hypoxic and exercise stresses. Specific studies in this population of elite climbers are also required; indeed they may exhibit specific physiological characteristics (Bernardi 2006; Puthon et al. 2016) making inappropriate the transposition of physiological observations from other populations of mountain athletes or activities at lower altitudes (Neumayr 2004; Billat et al. 2010; Duc et al. 2011; Fornasiero et al. 2018).

It is well-established that prolonged exercise such as ultra-marathon can induce acute and temporary cardiac modifications including changes in left (LV) and right (RV) ventricular dimensions and functions, a phenomenon known as exercise-induced cardiac fatigue (Elliott and La Gerche 2015; Lord et al. 2018). Acute high-altitude exposure is also known to induce substantial cardiac and hemodynamic changes, mainly associated with the hypoxia-induced elevation in pulmonary vascular resistance (Allemann et al. 2004; Naeije 2010; Maufrays et al. 2017, 2019; De Boeck et al. 2018). Hence, while both prolonged exercise and acute high-altitude exposure are known to induce cardiac modifications, the cardiac impact of combining these two factors needs to be further investigated using exhaustive echocardiography measurements (Dávila-Román et al. 1997; Boos et al. 2014;

Stembridge et al. 2015). Moreover, changes in LV function induced by exercise and/or hypoxic exposure may be difficult to interpret using conventional echocardiographic measurements as LV ejection fraction (LVEF) since changes in heart rate (HR) or cardiac loading conditions associated with sympathetic activation may influence these parameters (Naeije 2010; Dalla Vecchia et al. 2014; Lord et al. 2018; Simpson et al. 2021). Therefore, conventional echocardiographic measurements may not allow to distinguish between intrinsic myocardial impairment and cardiac changes associated with systemic hemodynamic variations. Recent progress in ultrasound imaging, especially 2D speckle tracking echocardiography (STE), now allows to detect early impairments in LV function with a better sensitivity than conventional measurements in cardiac diseases (Smiseth et al. 2016) or in sports cardiology (Forsythe et al. 2018). However, longitudinal strain remains sensitive to the LV load (Smiseth et al. 2016). Approach of the myocardial efficiency through the measurement of systolic myocardial work (LV pressure–volume loops) could allow a load-independent LV mechanical assessment but requires an invasive procedure (Sørensen et al. 2020), hardly compatible with field investigations. Recently, a non-invasive and ultrasound-based myocardial work assessment using pressure–strain loops derived from STE has been developed (Russell et al. 2012; Boe et al. 2019) and has shown strong correlations with invasive measurements (Russell et al. 2012; Hubert et al. 2018). This attractive non-invasive method has been used for myocardial evaluation in patients suffering from heart diseases (Chan et al. 2019; Tadic et al. 2021) as well as in endurance athletes in three recent studies (Sengupta et al. 2020; D’Andrea et al. 2020; Tokodi et al. 2021), but never with a focus on exercise-induced cardiac muscle fatigue or in high-altitude conditions.

The aim of this study was to describe the global cardiologic response to a speed high-altitude ascent in elite climbers and specifically changes in the LV systolic function using new echocardiograph-derived myocardial work assessment. We hypothesized that a speed high-altitude ascent would induce cardiac fatigue in elite trained climbers, especially with a decrease in LV myocardial work.

## Methods

### Ethical approval

This study was approved by a French ethic committee (CPP Ouest VI, approval reference number 2019-A01866-51) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, except for the registration in a database. All participants signed a written informed consent before inclusion.

## Participants

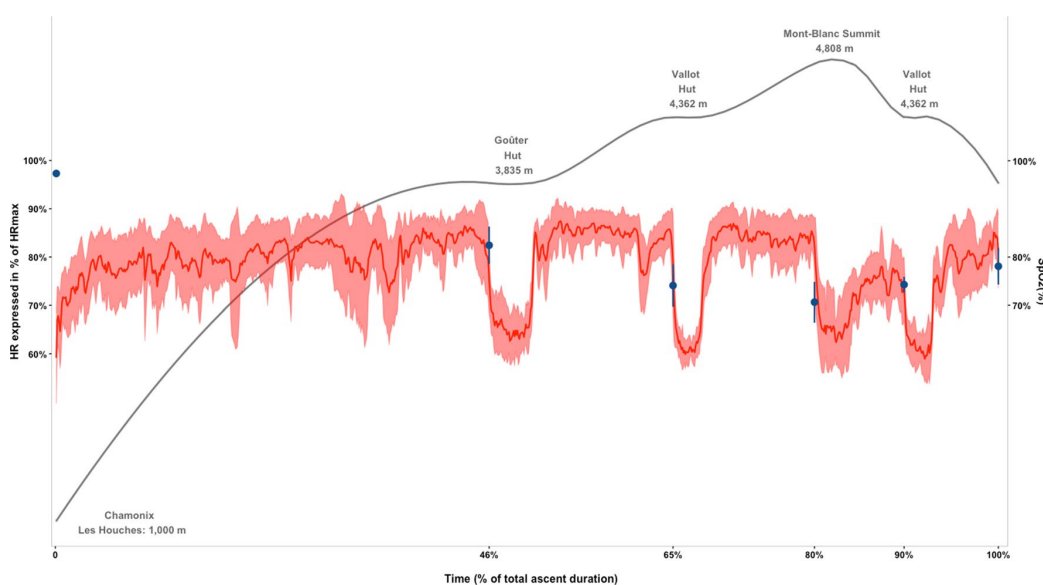
Elite climbers from the French national high-altitude climbing team were invited to participate in this prospective, observational, study including physiological evaluations before, during and after a direct ascent to the top of the Mont-Blanc (4808 m).

## Study protocol

The study was conducted in September 2019 and consisted in three phases: 1) pre-ascent measurements consisting in anthropometric and physiological measurements, venous blood sampling, questionnaires and a transthoracic echocardiography (TTE), 2) a direct and speed ascent of the Mont-Blanc (the highest mountain of Western Europe; 4808 m), starting from the valley (Chamonix-Les Houches, France, altitude: 1000 m) with + 3808 m of altitude and about 14 km to the summit (see Fig. 1 for ascent profile), following the French normal route and 3) post-ascent measurements including anthropometric measurements, venous blood sampling, questionnaires and TTE. This study is a part of a global altitude research project aiming to study the physiological impact of a speed high-altitude ascent in elite climbers and some results about

cognitive impact have been recently published (Champigneulle et al. 2022). However, except baseline subject characteristics, data presented in the present study have been never published.

Pre-ascent measurements were conducted in Chamonix-Les Houches (altitude: 1000 m). Post-ascent measurements were performed as soon as possible after arrival at the Goûter hut (3835 m), where the climbers went down as fast as possible (-973 m, about 4.1 km) after reaching the summit. During the ascent, pulse oxygen saturation ( $SpO_2$ , from a finger pulse oximeter after finger warming) and questionnaire assessments were performed at different altitude levels: 3835 m and 4362 m, corresponding to the different mountain huts along the normal route (Fig. 1), and upon arrival to the summit (4808 m). The departure was staggered between participants from 1:30 to 3:00 AM. Weather and route conditions were good and stable during the ascent. Atmospheric pressure was 683 mmHg at 1000 m during pre-ascent evaluations and 487 mmHg at 3835 m during post-ascent evaluations. The usual time of ascent to the Mont-Blanc by the same route by non-elite mountaineers is classically two days, with the first 1400-m ascent performed by using a tramway and with one night spent at the Goûter hut (3835 m) (Billat et al. 2010).



**Fig. 1** Ascent profile, kinetic of average heart rate (HR) expressed in percentage of maximal HR ( $HR_{max}$ ) and changes in average oxygen saturation ( $SpO_2$ ) at the different checkpoints during the ascent. Gray line represents the profile of the ascent up to the top of the Mont-Blanc, with the different huts and corresponding altitudes along the route. The red line represents the average HR of the elite climbers

( $n=11$ ) during the ascent (left y-axis), expressed as function of the average relative total exercise duration, while the red filled zone represents its standard deviation (SD). The blue dots and bars represent the  $SpO_2$  of the participants (mean  $\pm$  SD) measured at the different checkpoints (right y-axis)

## Non-cardiac assessment

### Maximal exercise test

Before the ascent, a maximal incremental test was performed on a motorized treadmill (T170, Cosmed, Rome, Italy) with a constant 15% slope. After a 4-min warm-up period at  $4 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$ , speed was increased to  $6 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$  and then by  $1 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$  every 2 min, until exhaustion. During the test, HR and respiratory gas exchanges were monitored breath by breath through a facemask (Quark b<sup>2</sup>, Cosmed, Rome, Italy). Peak oxygen uptake ( $\dot{V}\text{O}_{2\text{peak}}$ ) as well as maximal HR ( $\text{HR}_{\text{max}}$ ) were determined.

### Anthropometric measurements

Body mass (BM), body fat (expressed in % of BM) and total body water (expressed in % of BM) were measured pre-ascent, then repeated post-ascent at 3835 m, by using bioelectrical impedanceometry (SC240, Tanita Corp., Tokyo, Japan).

### Blood analysis

Hematocrit (Hct) and hemoglobin concentration [Hb] were measured using a microhematocrit centrifugation (Hemata STAT-II, Separation Technology Inc., Sandford, USA) and a Hb point-of-care testing (Hemocue® Hb201+, Hemocue AB, Ängelholm, Sweden), respectively, from a venous blood sample obtained pre- and post-ascent. Relative change in plasma volume ( $\Delta\text{PV}$ ) between pre- and post-ascent was calculated using the Dill and Costill equation (Dill and Costill 1974).

### Acute mountain sickness (AMS)

Participants completed the 2018 version of the Lake Louise Questionnaire (LLQ), pre-ascent (1000 m), during the ascent, and immediately post-ascent at 3835 m (Roach et al. 2018). A score derived from the questionnaire  $\geq 3$  (with  $\geq 1$  point for headache symptom) indicated the presence of AMS (Roach et al. 2018).

### Exercise intensity

Continuous heart rate (HR) recording during the ascent was used to assess exercise intensity. Heart rate, as well as speed ascent and GPS traces were continuously monitored for all participants during the ascent using a GPS sport-watch associated with a HR transmitter chest belt (Suunto®, Vantaa, Finland; Garmin®, Olathe, Kansas, USA; Polar®, Kempele, Finland). HR values were reported as percentage of  $\text{HR}_{\text{max}}$ . To consider the reduction of  $\text{HR}_{\text{max}}$  with altitude,  $\text{HR}_{\text{max}}$  was

corrected between 3835 and 4808 m, using a single mean value of altitude of 4300 m (a preliminary analysis using a 2-level altitude correction did not show significantly different results), using the following formula:

$$\text{HR}_{\text{max}} (\text{corrected}) = \text{HR}_{\text{max}} - 0.0024 \times (\text{altitude gain}) + 0.7296 \text{ (Mourot 2018)}.$$

To allow the graphical visualization of HR fluctuation during the ascent (Fig. 1), HR values were aggregated using a piecewise aggregate approximation algorithm function (Keogh et al. 2001) and expressed as a function of the average relative total exercise duration. To describe the exercise intensity during the ascent, four zones of intensity were used, according to the following HR values:  $< 70\%$  of  $\text{HR}_{\text{max}}$  (low intensity zone),  $70\text{--}80\%$  of  $\text{HR}_{\text{max}}$  (moderate intensity zone),  $80\text{--}90\%$  of  $\text{HR}_{\text{max}}$  (high intensity zone) and  $> 90\%$  of  $\text{HR}_{\text{max}}$  (very high intensity zone) (Neumayr 2004).

### Perceived exertion

Rating of perceived exertion (RPE) was evaluated using the original 6–20 Borg scale during the ascent and immediately after going down to 3835 m (Williams 2017).

### Echocardiography

All transthoracic echocardiographies were performed by the same experienced cardiologist (SD), before and immediately after the end of physical exertion. TTE was performed using a 3.5 MHz probe, connected to a Vivid IQ echocardiograph (GE Vingmed Ultrasound, Horten, Norway). Acquired images and cine-loops were stored for subsequent analysis using a dedicated software (EchoPAC version 203, GE Vingmed Ultrasound, Horten, Norway).

Standard 2D, M-mode and Doppler measurements were conducted according to current guidelines (Rudski et al. 2010; Lang et al. 2015; Nagueh et al. 2016). The LVEF was calculated using the biplane Simpson method. Global longitudinal strain (GLS) of LV was calculated in an 18-segment model from the apical 4-chamber, the apical 2-chamber, and the apical long-axis views. Mid LV radial strain was calculated from a mid-ventricular parasternal short-axis view. Special attention was given to image quality and frame rate (Lang et al. 2015). LV diastolic function was assessed by registration of pulsed mitral Doppler (Peak E and peak A velocities, E/A ratio) as well as the lateral annular early diastolic  $e'$  velocity using tissue Doppler, reflexing the LV intrinsic relaxation (Nagueh et al. 2016). Right ventricular global systolic function was assessed by the RV fractional area change (RV FAC), the pulsed tissue Doppler peak velocity at the tricuspid annulus (S') (Rudski et al. 2010) and by the measurement of the RV free wall longitudinal strain obtained in STE (Lang et al. 2015). Systolic pulmonary artery pressure (sPAP) was calculated from the peak velocity

of the tricuspid regurgitation using the simplified Bernoulli equation (Rudski et al. 2010). Mean pulmonary artery pressure (mPAP) was calculated from the formula:  $mPAP = (0.61 \times sPAP) + 2$  (Chemla et al. 2004). Doppler velocities of the transtricuspid flow were measured using pulsed Doppler (peak E, peak A, E/A ratio). Interaction between RV and LV was assessed in parasternal short-axis view at the mid-papillary level, first by a visual assessment of the septum geometry in systole (classified as normal, intermediate or flattened) and secondly by computation of the LV end-systolic eccentricity index (LVEI), as follow:  $LVEI = \frac{LV \text{ anteroposterior dimension}}{LV \text{ septolateral dimension}}$ . An LVEI > 1 in systole may suggest a RV pressure overload (Rudski et al. 2010).

### Myocardial work assessment

LV pressure–strain loops were computed from STE and the estimation of the peak of systolic LV pressure using a specific algorithm from a commercial dedicated software (EchoPAC, version 203, GE Vingmed Ultrasound, Horten, Norway), as previously described, for each myocardial segment (Chan et al. 2019; Sengupta et al. 2020; D’Andrea et al. 2020; Tadic et al. 2021). Peak of systolic LV pressure was estimated by the brachial systolic arterial blood pressure (ABP). From a global built LV pressure–strain loop, myocardial work index (MWI) was defined as the total area within the loop. Three other indices were derived: the global constructive work (GCW), corresponding to the work contributing to LV ejection (i.e. myocardial shortening in systole adding the work produced by the myocardial lengthening in isovolumetric relaxation); the global wasted work (GWW), corresponding to the work produced by LV that do not contributed to LV ejection (i.e. myocardial lengthening during systole adding myocardial shortening in isovolumetric relaxation); and the global work efficiency (GWE), corresponding to the ratio between GCW and the total work (GWW plus GCW).

### Statistical analysis

Continuous variables were reported as means  $\pm$  standard deviation (SD). Normality of distribution was assessed using a Shapiro–Wilk test. Pre- vs. post-ascent continuous variables were compared using paired Student *t*-tests. A one-way repeated measure analysis of variance (ANOVA) was performed to assess changes in continuous variables measured during the ascent. Categorical variable was expressed as number and percentage (%) and was compared using a McNemar–Bowker test of symmetry. Correlations between continuous variables and between their pre-post percent changes through the ascent were performed using Pearson correlation coefficients. All statistical analyses were performed using R version 3.4.2

for Mac OS, GNU General Public Licenses GNU (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) and GraphPad Prism version 9.0.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All tests were two-sided and a *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Participants’ characteristics

Eleven elite climbers (9 males and 2 females) participated in the study (Table 1). All were free of any medical history or medication and non-smokers. As shown in Table 1, mean  $\dot{V}O_{2peak}$  reflected high aerobic capacities. All participants, except one, were exposed to an altitude > 3000 m during the previous month. None had previous history of severe AMS.

### Speed ascent responses

#### Climbing performance

All climbers completed the ascent. The total ascent duration was 8 h 58 min  $\pm$  60 min, including 7 h 10 min  $\pm$  42 min to the summit. Detailed time and speed of ascent are reported in the Table 2. Among the pre-ascent physiological variables (Table 1), only  $\dot{V}O_{2peak}$  was significantly correlated with the climbing performance (i.e., the total exercise duration:  $r = -0.61$ ,  $p = 0.048$ ).

**Table 1** Demographic and physiological pre-ascent characteristics of the participants

	Elite climbers ( <i>n</i> = 11)
Demographic data	
Age (years)	26 $\pm$ 4
Altitude of residence (m)	606 $\pm$ 452
Anthropometric data	
Body mass (kg)	67.0 $\pm$ 9.0
Height (cm)	175.5 $\pm$ 6.8
BMI (kg·m <sup>-2</sup> )	21.7 $\pm$ 2.0
Body fat mass (%)	13.3 $\pm$ 3.8
Total body water mass (%)	61.0 $\pm$ 3.4
Maximal exercise test	
Rest HR (bpm)	59 $\pm$ 10
HR <sub>max</sub> (bpm)	193 $\pm$ 8
$\dot{V}O_{2peak}$ (mL·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	61.0 $\pm$ 5.9

Data are expressed as mean  $\pm$  SD

BMI body mass index,  $\dot{V}O_{2peak}$  peak oxygen uptake, HR heart rate, HR<sub>max</sub> maximal HR

**Table 2** Heart rate and vertical speed during the ascent

	Uphill Section 1 1000 – 3835 m	Uphill Section 2 3835 – 4808 m	Downhill section 4808 – 3835 m
Relative time (%) in each HR zone			
< 70% of HR <sub>max</sub>	18 ± 14	14 ± 3	44 ± 15
70%–80% of HR <sub>max</sub>	31 ± 19	17 ± 18	34 ± 9
80%–90% of HR <sub>max</sub>	47 ± 25	62 ± 17	21 ± 17
≥ 90% of HR <sub>max</sub>	4 ± 6	7 ± 10	1 ± 2
Mean HR (bpm)	151 ± 11	150 ± 7	133 ± 11
Mean HR (% of HR <sub>max</sub> )	79 ± 5	82 ± 3	72 ± 5
Denivelation (m)	+2,835	+973	– 973
Distance (km) <sup>a</sup>	9.8	4.1	4.1
Vertical speed (m·h <sup>-1</sup> )	+626 ± 76	+391 ± 75	– 570 ± 144
Section duration (min)	275 ± 33	154 ± 28	109 ± 29

Data are expressed as mean ± SD

HR heart rate, HR<sub>max</sub> maximal HR

<sup>a</sup> Approximate covered distance

**Table 3** SpO<sub>2</sub> and questionnaires assessment during the ascent

	Pre-ascent (1000 m)	Uphill (3835 m)	Uphill (4362 m)	Summit (4808 m)	Downhill (4362 m)	Post-ascent (3835 m)	<i>P</i>
SpO <sub>2</sub> (%)	97 ± 1	83 ± 4	74 ± 4	71 ± 4	74 ± 2	78 ± 4	< 0.001
Borg RPE score	–	14 ± 2	15 ± 2	17 ± 2	–	14 ± 2	0.007
LLQ							
LLQ score	0.5 ± 0.5	1.6 ± 0.5	3.4 ± 1.2	3.6 ± 1.4	–	2.8 ± 1.3	< 0.001
AMS, <i>n</i> (%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (45%)	4 (36%)	–	4 (36%)	–

Data are expressed as mean ± SD or number (percentage)

RPE, rate of perceived exertion; LLQ, Lake Louise Questionnaire; AMS, acute mountain sickness

### Exercise intensity

Changes in HR during the ascent are shown in Fig. 1 and in Table 2. The average HR during the ascent was 147 ± 9 bpm (78 ± 4% of HR<sub>max</sub>). Participants remained 49 ± 18% of the ascent duration above 80% HR<sub>max</sub>. High exercise intensity level during the ascent was corroborated by average RPE ranging from a “somewhat hard” to “hard” perceived exertion (Table 3).

### Hypoxic load

Progressive hypoxemia was observed during the ascent (Fig. 1 and Table 3), until reaching a minimal SpO<sub>2</sub> value of 71 ± 4% at summit arrival (4808 m). AMS occurred in some climbers during the ascent (Table 3), with a maximal prevalence of 45% at 4362 m. Neither SpO<sub>2</sub> nor LLQ score during the ascent were significantly correlated with the climbing performance.

**Table 4** Anthropometric measurements pre- and post-ascent

	Pre-ascent (1000 m)	Post-ascent (3835 m)	<i>P</i>
Body mass (kg)	67.0 (9.0)	67.2 (9.5)	0.59
Body fat mass (%)	13.3 (3.8)	13.1 (3.6)	0.66
Total body water mass (%)	61.0 (3.4)	61.1 (3.2)	0.74

Data are expressed as mean ± SD or number (percentage)

### Anthropometry

No significant change in BM, as well as body water or body fat composition were observed post-ascent (Table 4).

### Hematocrit, [Hb] and PV change

Hct decreased from 46.9 ± 1.4% to 44.0 ± 1.1% (*p* = 0.001) and [Hb] also decreased from 15.2 ± 1.0 g·dL<sup>-1</sup> to

$14.5 \pm 0.5 \text{ g} \cdot \text{dL}^{-1}$  ( $p=0.01$ ). Calculation of  $\Delta\text{PV}$  indicated an increase of plasma volume of  $10.7 \pm 8.5\%$  from pre- to post-ascent.

### Cardio-vascular impact of the ascent

Post-ascent TTE was performed with a delay of  $19 \pm 15$  min after arrival to the hut.

#### Hemodynamic

Post-ascent measurements (Table 5) showed an increase in mean HR (absolute change:  $+35 \pm 12$  bpm,  $p < 0.001$ ) and a decrease in systolic BP ( $-8 \pm 7\%$ ,  $p=0.006$ ). CI increased by  $39 \pm 38\%$  ( $p=0.003$ ), despite a decrease in stroke volume (SV,  $-14 \pm 15\%$ ,  $p=0.001$ ). mPAP significantly increased post-ascent ( $+55 \pm 20\%$ ,  $p < 0.001$ ).

#### Right ventricle

Pre-ascent, RV was slightly dilated as classically observed in endurance athletes. RV showed a significant dilatation post-ascent: indexed RV area increased at the end of systole ( $+46 \pm 56\%$ ,  $p=0.02$ ), with a similar trend at the end of diastole ( $+17 \pm 26\%$ ,  $p=0.07$ ). All markers of systolic RV function (RV FAC, S' velocity and RV free wall strain) pointed towards a decrease in RV systolic function post-ascent (Table 5). In particular, RV FAC decreased by  $-20 \pm 23\%$  ( $p=0.01$ ). Moreover, RV filling pattern (E/A ratio) was significantly modified post-ascent (Table 5). Maximal inferior vena cava diameter increased by  $10 \pm 9\%$  ( $p=0.005$ ).

#### Left ventricle

Decrease in left ventricle end-diastolic (LVED) volume was marked ( $-17 \pm 10\%$ ,  $p=0.001$ ) and was negatively correlated with the increase in mPAP ( $r=-0.93$ ,  $p < 0.001$ ) but not with the change in HR ( $r=0.05$ ,  $p=0.88$ ). LV GLS decreased by  $8 \pm 9\%$  ( $p=0.02$ ) and mid LV radial strain by  $-28 \pm 24\%$  ( $p=0.004$ ). MWI decreased by  $21 \pm 16\%$  ( $p=0.004$ , Fig. 2a) and GWE decreased by  $4 \pm 4\%$  ( $p=0.007$ , Fig. 2b), without significant variation of both global constructive and wasted work (Fig. 2c, d, respectively). Post-ascent, LV filling pattern was significantly modified (Table 5). The decrease in MWI was inversely correlated with the changes in GWW ( $r=-0.86$ ,  $p=0.003$ ) but not with those in GCW ( $r=0.38$ ,  $p=0.32$ ). The decrease in GWE was also inversely correlated with the changes in GWW ( $r=-0.97$ ,  $p < 0.001$ ) but not in GCW ( $r=0.13$ ,  $p=0.73$ ). The changes in MWI were significantly correlated

with changes in both LV GLS ( $r=0.71$ ,  $p=0.03$ ) and systolic ABP ( $r=0.71$ ,  $p=0.03$ ), but not with the changes in the E/A mitral ratio ( $r=0.63$ ,  $p=0.07$ ) or HR ( $r=0.56$ ,  $p=0.12$ ). The decrease in LV GLS was inversely correlated with the changes in GWW ( $r=-0.78$ ,  $p=0.01$ ), but not in GCW ( $r=0.10$ ,  $p=0.80$ ). No significant correlation between changes in mid LV radial strain and in MWI (and derived indexes) were observed (all  $p > 0.05$ ).

#### RV and LV interaction

LVEI increased by  $27 \pm 14\%$  ( $p < 0.001$ ) from pre- to post-ascent together with emergence of a septal flattening in about 50% of the participants (Fig. 3 and Electronic Supplementary Material Video S1), suggesting a RV pressure overload.

#### Correlations of TTE variables with performance and AMS

Neither markers of ventricular systolic functions (LVEF, RV FAC, STE and myocardial work indices) in pre- or post-ascent conditions, nor their changes across the ascent were significantly correlated with the aerobic capacities ( $\dot{V}\text{O}_{2\text{peak}}$ ), the climbers' performance (i.e. total exercise duration), or the LLQ scores (Table 3) measured during the ascent.

## Discussion

In this exploratory study, we characterized the changes in cardiac function induced by a mountaineering speed ascent in elite climbers. We showed a significant cardiac impact of combined high-intensity prolonged exercise and hypoxic exposure, including an enlargement of RV associated with a decrease in LV volumes, a geometric change in bi-ventricular interaction and a bi-ventricular decrease of both systolic and diastolic functions. Moreover, MWI, a new non-invasive tool for myocardial work assessment, was significantly decreased after the speed ascent.

#### A fast and intensive ascent

Physiological data obtained during the ascent confirmed that mountaineering speed ascent represent a high-intensity exercise. Furthermore, the exertion was prolonged and associated with a severe hypoxemia. Occurrence of AMS in this study likely reflected the effect of severe exertion during speed climbing on the perception of the non-specific symptoms characterizing AMS (Rupp et al. 2013), according with the fact that AMS is generally considered to develop after  $> 6$  h at high altitude (Hackett and Roach 2001).

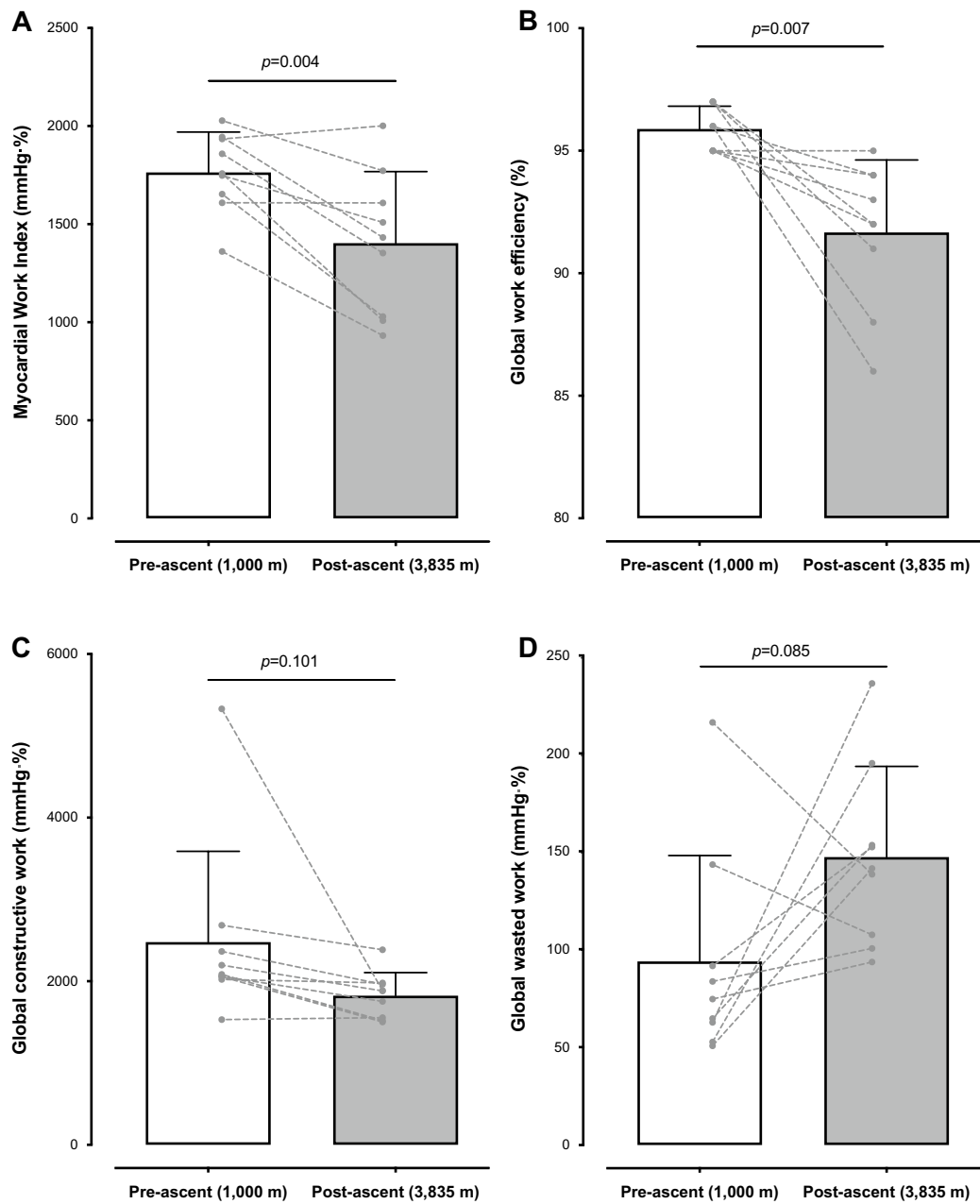
**Table 5** Hemodynamic and echocardiographic parameters recorded during pre- and post-ascent measurements

	Pre-ascent (1000 m)	Post-ascent (3835 m)	<i>P</i>
Systemic hemodynamic variables			
Systolic BP (mmHg)	124±10	115 ± 13	0.006
Diastolic BP (mmHg)	72±5	66 ± 12	0.07
Mean BP (mmHg)	90 ± 7	82 ± 11	0.02
HR (bpm)	61 ± 9	95 ± 7	<0.001
Left and right atria			
LA volume (mL m <sup>-2</sup> )	33.4 ± 4.7	32.9 ± 8.2	0.82
RA volume (mL m <sup>-2</sup> )	30.3 ± 4.7	32.1 ± 6.6	0.23
Left ventricle			
LV morphology			
LV ED diameter (mm)	49.3 ± 4.4	45.6 ± 4.7	<0.001
LV ES diameter (mm)	32.4 ± 2.5	31.7 ± 3.1	0.32
Septal wall thickness (mm)	9.1±1.0	9.7±1.0	0.03
Posterior wall thickness (mm)	8.9±1.2	9.4±1.3	0.05
LV ED volume (mL)	115.9 ± 17.7	96.6 ± 19.2	0.001
LV ES volume (mL)	47.5 ± 8.3	42.6 ± 9.7	0.04
Indexed LV mass (g m <sup>-2</sup> )	96.4±20.3	96.9 ± 23.1	0.91
LV systolic function			
LV shortening fraction (%)	34.2 ± 4.0	30.9 ± 2.3	0.02
LVEF - Simpson (%)	59.2 ± 2.4	55.6±6.5	0.06
Stroke volume (mL)	68.3±10.4	53.7 ± 12.8	0.001
Cardiac index (L min <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> )	2.9±0.7	4.0±0.8	0.003
LV GLS (%)	-19.5 ± 1.3	-17.9±2.4	0.02
Mid LV radial strain (%)	-19.3±2.6	-13.6±5.0	0.004
LV diastolic function			
Peak E	74.1±9.1	60.5±8.2	0.001
Peak A (cm s <sup>-1</sup> )	45.3±9.3	60.5±15.1	0.01
E/A ratio	1.7±0.5	1.0±0.2	0.002
Peak e' (cm s <sup>-1</sup> )	17.5±2.6	14.9 ± 2.6	0.02
Right ventricle			
RV morphology			
Indexed RV ED area (cm <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> )	13.3±1.9	15.2±2.5	0.07
Indexed RV ES area (cm <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> )	7.1±2.0	9.6±2.3	0.02
RV pressure estimation			
Maximal IVC diameter (mm)	20.5 3.1	22.3±2.8	0.005
mPAP (mmHg) <sup>b</sup>	19.1 1.5	29.7±4.7	<0.001
RV systolic function			
RV FAC (%)	47.7 8.0	37.2±8.8	0.01
S' velocity (mm s <sup>-1</sup> )	15.2 1.8	13.7±1.4	0.02
RV free wall strain (%)	-23.9 2.6	-20.6±3.4	0.04
RV diastolic function			
Peak E (cm s <sup>-1</sup> )	50.2±8.7	43.0±10.4	0.14
Peak A (cm s <sup>-1</sup> )	25.1±3.4	45.6±10.5	<0.001
E/A ratio	2.1±0.6	1.0±0.2	<0.001
RV-LV interaction			
LVES eccentricity index	1.2±0.1	1.4±0.2	<0.001
Septum geometry in systole			
Normal	11 (100 %)	1 (9.0%)	
Intermediate	0 (0 %)	5 (45.5%)	<0.001
Flattened	0 (0 %)	5 (45.5%)	

Data are expressed as mean ± SD or number (percentage)

BP blood pressure, HR heart rate, LA left atrial, RA right atrial, LV left ventricle, ES end-systolic, ED end-diastolic, EF ejection fraction, GLS global longitudinal strain, RV right ventricle, IVC inferior vena cava, mPAP mean pulmonary artery pressure, RV FAC right ventricle fractional area change

<sup>a</sup>Missing value for 1 subject (9%). <sup>b</sup> Missing value for 3 subjects (27%)

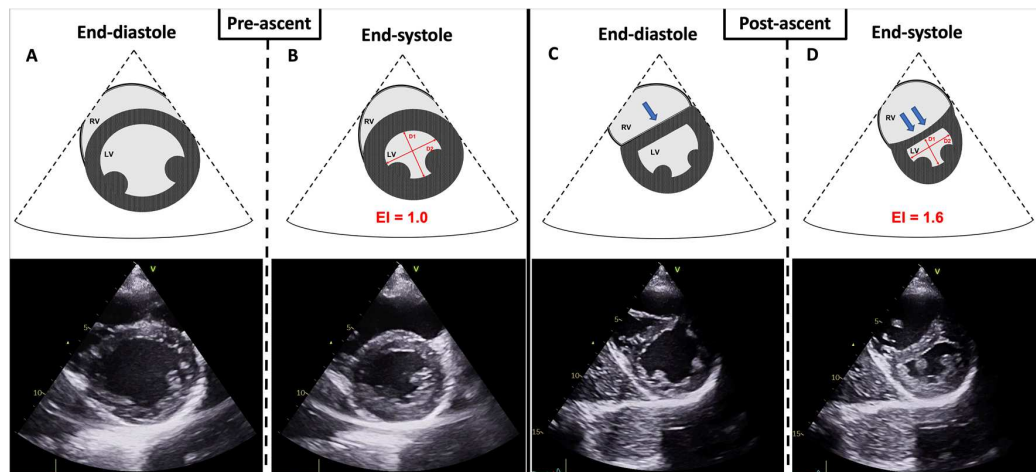


**Fig. 2** Myocardial work indices measured pre- and post-ascent. Bar plots and errors bars represent means values and standard deviation whereas connected dots represent individual variations (data missing for 2 participants,  $n=9$  participants)

**A major RV impact**

As shown in Fig. 3, Video S1 and in Table 5, we observed substantial changes at the RV level post-ascent, which seemed greater (when considering RV FAC) than previously reported following prolonged exercise (Elliott and La

Gerche 2015). An important mechanism that could explain the greater decrease in RV systolic function is the large increase in mPAP, leading to a prolonged RV pressure overload. Exercise alone is well-known to increase PAP and RV end-systolic stress especially in high-level athletes (La Gerche et al. 2011) and may induce a significant albeit transitory



**Fig. 3** Change in RV–LV interaction from pre- to post-ascent TTE in one participant, representative of the 50% of the participants in whom a septal flattening was observed post-ascent (see also Video S1). Each panel provides a schematic representation of a TTE parasternal short-axis view (at the papillary muscle level), obtained pre-ascent at the end of diastole (panel A) and at the end of systole (panel B); post-ascent at the end of diastole (panel C) and at the end of systole (panel D). LV EI was computed as the ratio between D2 (LV anteroposterior dimension) and D1 (LV septolateral dimension) as represented

in red in the panel B et D (Rudski et al. 2010). The combination of both post-ascent increase in RV afterload and decrease in RV systolic function induced a RV dilatation associated with a flattening septum, leading to a D-shaped LV. The emphasis of the D-shaped LV at the end of systole post-ascent (with a reversal septal curvature as shown in the TTE view and represented by the blue arrows, panel D) as well as the large increase in LV end-systolic EI suggest a RV pressure overload post-ascent (Rudski et al. 2010). *RV* right ventricle, *LV* left ventricle, *TTE* transthoracic echocardiography, *EI* eccentricity index

decrease in the RV systolic function after long-endurance exercise (Elliott and La Gerche 2015). Acute high-altitude exposure is also known to induce hypoxic pulmonary vasoconstriction but does not classically lead by itself to RV systolic change at rest (Naeije 2010; Maufrais et al. 2017, 2019; De Boeck et al. 2018). However, the present results highlight that the additive effects of exercise and hypoxia on RV afterload and RV end-systolic stress can induce a decrease in RV systolic function in trained and partially acclimatized elite climbers after a high-altitude speed ascent, as shown in a previous study (Dávila-Román et al. 1997), in particular because the thin RV wall is not built to counterbalance the increase in PAP and the wall stress associated with exercise (La Gerche et al. 2011).

### Appraisal of LV systolic changes could benefit from the use of MWI

Decrease in LV systolic function has previously been well-described in many studies after long-duration exercise (Lord et al. 2018). The proposed main mechanisms pertaining the post-exercise decrease in LV systolic function include beta-adrenergic receptor downregulation, myocardial damage or stunning, and load changes (which cannot explain the changes in TTE observed in the present study by themselves) (Lord et al. 2018). As high-altitude exposure alone does not seem to decrease LV systolic function (Maufrais et al. 2017,

2019; De Boeck et al. 2018) or may even be associated with an increase in LVEF (Allemann et al. 2004; Stembridge et al. 2015), we postulate that the changes in LV systolic function observed in the present study (Table 5 and Fig. 2) are mostly the consequence of the sustained exercise. When considering LVEF calculated by the biplane Simpson method (Lang et al. 2015), change in LV systolic function seemed less marked. LVEF is known to be highly sensitive to changes in LV load conditions (Cikes and Solomon 2016) which varied significantly in the present study. LV GLS, a more sensitive and less load-dependent index of LV function (Cikes and Solomon 2016), well-validated in the context of both high altitude and endurance exercise (Maufrais et al. 2017, 2019; Lord et al. 2018), decreased significantly post-ascent in the present study. Thus, the use of a sensitive TTE marker for LV systolic assessment in conditions combining exercise and hypoxic exposure as in the present study appears relevant. Furthermore, due to the systemic hemodynamics changes induced by both hypoxia and exercise (Naeije 2010; Lord et al. 2018), the preferred LV systolic marker should be also as much load-independent as possible.

In this context, MWI (and its derivate's indices), which correlates well with invasive measurements and reflects myocardial metabolism (Russell et al. 2012; Hubert et al. 2018), could represent a promising marker of LV impairment and LV performance (Boe et al. 2019). The significant correlation observed between MWI variation and both

LV GLS and systolic ABP variation through the ascent was expected, since MWI calculation is computed from these 2 parameters (Manganaro et al. 2020). The tendency of GWW to increase (Fig. 2d) post ascent, as well as the significant inverse correlation between the change in GWW and changes in MWI, GWE and LV GLS, suggests that the observed post-ascent reduction in systolic myocardial performance is more likely a consequence of a larger myocardial wasted work than a decrease in myocardial constructive work. These mechanisms remain to be further investigated in athletes. The present MWI data are difficult to compare with previous published studies since, to the best of our knowledge, this is the first study using MWI in the context of high-altitude exposure to describe exercise-induced cardiac fatigue. No global change in MWI was previously reported after a half-marathon (Sengupta et al. 2020), but the duration and intensity of this exercise performed by recreational athletes were hardly comparable with the conditions of the present study. Finally, using highly trained athletes we did not find any association between the myocardial efficiency (reflected by pre-ascent MWI or its variations through the ascent) and the  $\dot{V}O_{2peak}$  or the sport performance as others shown in endurance athletes or hypertensive patients (D'Andrea et al. 2020; Tadic et al. 2021; Tokodi et al. 2021). If MWI could represent a new sensitive ultrasound index to assess myocardial fatigue, its superiority compared to LV GLS, as a more sensitive or early marker, needs to be further confirmed.

### A change in right diastolic pattern

RV filling pattern was substantially modified post-ascent, with an increase in late filling, as already observed with a lower magnitude after acute (Maufrais et al. 2017) and prolonged (Maufrais et al. 2019) high-altitude exposure, and which may be explained at least in part by tachycardia (Naeije 2010). In the present study, tachycardia was likely the consequence of an activation of the sympathetic nervous system secondary to both hypoxia and prolonged strenuous exercise (Naeije 2010; Lord et al. 2018). In addition, the vascular volumetric changes associated with the ascent may play a role on RV filling. It is reasonable to assume that the calculated  $\Delta PV$  represents a valid estimate of the post-ascent PV expansion, assuming that total red blood cell volume was affected neither by the short altitude exposure (Siebenmann et al. 2017) nor by the prolonged exercise and exercise-induced hemolysis (Robach et al. 2014). Although this result may seem contrasting with the early PV reduction seen at high altitude, here the exposure to altitude was likely too short to initiate such change. It is more plausible that PV expansion was induced by prolonged exercise, as shown after a mountain ultramarathon (Robach et al. 2014). In summary, we postulate that the increase in PV combined

with the concomitant reduction in RV systolic function could increase the RV preload, as suggested, otherwise, by the increase in the inferior vena cava diameter after the ascent.

### RV–LV interdependency may drive a LV diastolic impairment

In all participants but one, we observed a significant change in LV geometry associated with an abnormal septum motion induced by the increase in PAP (De Boeck et al. 2018). This observation has been reported after strenuous exercise at altitude (Dávila-Román et al. 1997) and may explain the LV diastolic change and the post-ascent decrease in LVED volume observed in the present study, as suggested by the strong inverse correlation between mPAP and LVED volume changes. Conversely, the absence of statistical relationship between HR and LVED volume changes, suggests that the increase in HR (leading to shorter LV filling time) had no major effect on the LV preload change post-ascent. Similar modified pattern of LV filling was previously described after prolonged exercise (Lord et al. 2018) and high-altitude exposure (Allemann et al. 2004; Maufrais et al. 2019). At high altitude, the decrease in mitral E/A has been shown correlated with the elevation in PAP (Allemann et al. 2004) and could be the consequence of an altered relaxation induced by the modified LV geometry and flattening septum (Maufrais et al. 2017, 2019). These assumptions have been corroborated by a recent RV–LV interaction physiological study highlighting an alteration of the LV diastolic compliance and then a decrease in LVED volume following pulmonary artery occlusion (Pinsky 2020).

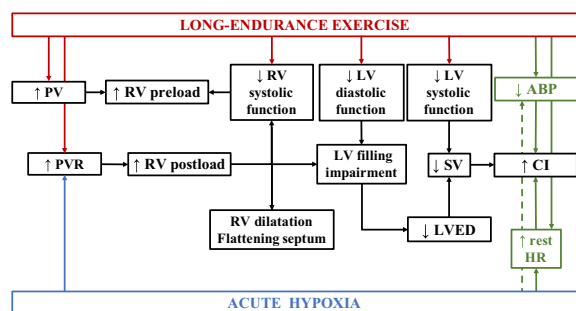
### Some compensatory hemodynamic mechanisms

In our study, the important decrease in LVED volume post-ascent participated, alongside the intrinsic decrease in LV systolic function, in the decreased SV. Despite this reduced SV, the increased HR and the decreased LV afterload (as reflected by ABP) allowed an increased cardiac output post-ascent. According to the literature, these hemodynamics post-ascent changes seem mainly triggered by a change in the sympathetic vagal balance that could have been induced by both hypoxia and strenuous exercise (Naeije 2010; Dalla Vecchia et al. 2014; Lord et al. 2018; Simpson et al. 2021). However, if the post-ascent HR increase may be the consequence of sympathetic activation induced by both hypoxia and exercise, the impact of hypoxia on the post-ascent decrease in ABP remains to investigate, as hypoxic exposure usually induces an increase in ABP through sympathoexcitation (Simpson et al. 2021). Postexercise hypotension (PEH) is a well-known phenomenon after exercise and involves notably a postexercise baroreflex resetting (for review, see Halliwill et al. 2013). The effect of hypoxia on PEH remains

mostly under investigated, but at identical workload, a recent study highlighted that a hypoxic exercise (simulated altitude ~3000 m), compared to a normoxic condition, was associated with a similar but longer PEH (thus evoking a delayed cardiac autonomic recovery), and with a decrease in cardiac baroreflex sensitivity (Fornasiero et al. 2021).

Based on previous reports (Dávila-Román et al. 1997; Allemann et al. 2004; Naeije 2010; Halliwill et al. 2013; Boos et al. 2014; Elliott and La Gerche 2015; Stembridge et al. 2015; Maufrais et al. 2017, 2019; De Boeck et al. 2018; Lord et al. 2018; Fornasiero et al. 2021), we propose in Fig. 4 a schematic overview of the cardiac changes observed after a speed ascent at high altitude as in the present study.

Our study has several limitations. The sample size was small (corresponding to the entire French national high-altitude climbing team) which may have limited the statistical power (for GWW changes for example); however, despite a small sample, the pre-post ascent changes were both clinically and statistically significant, especially regarding the RV and LV-RV interaction parameters. Although climbing at high altitude represents a unique stress combination for the heart, this field study did not allow to detangle the



**Fig. 4** Proposed schematic explanation of observed cardiac changes after a speed ascent at high altitude according to the present results and previous findings from the literature (Dávila-Román et al. 1997; Allemann et al. 2004; Naeije 2010; Halliwill et al. 2013; Boos et al. 2014; Elliott and La Gerche 2015; Stembridge et al. 2015; Maufrais et al. 2017, 2019; De Boeck et al. 2018; Lord et al. 2018; Fornasiero et al. 2021). Both acute hypoxia and sustained exercise contribute to the RV dilatation and associated decrease in systolic function, mainly by a mechanism of pressure overload. Decrease in LV systolic function is triggered by the exercise without further influence of hypoxia. RV dilatation then RV–LV interaction can participate to the LV filling impairment (leading to a decrease in LVED volume and thus in stroke volume). Hemodynamic changes post-ascent (increase in HR and decrease in ABP), assumed to be triggered by changes in sympathetic-vagal balance, allow an increase in CI. Red arrows show changes induced by long-endurance exercise whereas blue arrow shows changes attributed to acute hypoxia. Hemodynamic changes attributed to autonomic nervous system balance modification are depicted in green. Dotted arrow represents uncertain mechanism. *PV* plasma volume, *PVR* pulmonary vascular resistance, *RV* right ventricle, *LV* left ventricle, *LVED* left ventricle end-diastolic, *SV* stroke volume, *ABP* arterial blood pressure, *CI* cardiac index, *HR* heart rate

respective effects of a prolonged endurance exercise and of an acute hypoxic exposure on cardiac function. However, these two factors are nevertheless imbricated as exercise is well-known to increase hypoxemia at high altitude (Rupp et al. 2013), and the combination of these two factors on the field (when speed mountaineering is performed) offers a unique model of cardiac stress. Further studies are required to investigate the mechanisms underlying cardiac fatigue following speed ascent at high altitude as performed by numerous elite-mountaineers in the Alps and other high-altitude regions throughout the world. In particular, quantification of myocardial injury (e.g. using troponin) or investigation of the autonomic cardiovascular balance (e.g. using HR variability and baroreflex sensitivity measurements) associated with cardiac fatigue should be of interest in this setting. Moreover, since only two females were included in the present study, sex-specificity of cardiac changes associated with hypoxic prolonged sustained exercise remains to be investigated.

## Conclusion

Prolonged speed climbing at high altitude in elite climbers is associated with bi-ventricular diastolic and systolic changes, notably with a RV enlargement and pressure overload, a major alteration in RV–LV interaction and a decrease in LV systolic function and performance, highlighted by both GLS and MWI changes post-ascent.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00421-022-04895-6>.

**Acknowledgements** We thank the elite-climbers of the FFCAM and their supervisors for their enthusiastic participation, as well as the staff of the Goûter hut for technical assistance, Julia Roger-Veyer (RN) for expert technical assistance and the *Centre national de la recherche scientifique* (CNRS) *délégation Alpes*, for the provision of the Vallois Observatory. Two climbers from the *Groupe Excellence National Alpinisme* (GEAN), who participated in the study, accidentally passed away during the first ascent of the West face of the Mingbo Eiger (6070m) in Nepal, during collation of this manuscript. The authors express their sincere condolences to the climbers' families and friends.

**Author contributions** BC, SD, SB, JVB, PR, PB and SV designed the study and acquired the data. BC and SD performed the statistical analysis. BC, SD, SB and SV analyzed and interpreted the data. BC, SD and SV wrote the manuscript; PB, PR, JVB and SB revised it critically for important intellectual content. All authors gave final approval and agreed to be accountable for all aspects of work ensuring integrity and accuracy.

**Funding** This study was supported by a grant from the FFCAM (*Fédération Française des Clubs Alpins et de Montagne*). However, the sponsor had no further involvement in any step of the project.

**Availability of data and materials** The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Code availability** Not applicable.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors have no conflicts of interest to declare that are relevant to the content of this article.

**Ethical approval** This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the French Ethics Committee CPP Ouest VI (approval reference number 2019-A01866-51).

**Consent to participate** Written informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

**Consent to publication** The authors affirm that human research participants provided informed consent for publication.

## References

- Allemann Y, Rotter M, Hutter D et al (2004) Impact of acute hypoxic pulmonary hypertension on LV diastolic function in healthy mountaineers at high altitude. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 286:H856–H862. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00518.2003>
- Bernardi L (2006) Hypoxic ventilatory response in successful extreme altitude climbers. *Eur Respir J* 27:165–171. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00015805>
- Billat VL, Dupré M, Karp JR, Koralsztein JP (2010) Mountaineering experience decreases the net oxygen cost of climbing Mont Blanc (4808 m). *Eur J Appl Physiol* 108:1209–1216. <https://doi.org/10.1007/s00421-009-1334-9>
- Boe E, Skulstad H, Smiseth OA (2019) Myocardial work by echocardiography: a novel method ready for clinical testing. *Eur Heart J - Cardiovasc Imaging* 20:18–20. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jev156>
- Boos CJ, Mellor A, Begley J et al (2014) The effects of exercise at high altitude on high-sensitivity cardiac troponin release and associated biventricular cardiac function. *Clin Res Cardiol* 103:291–299. <https://doi.org/10.1007/s00392-013-0654-2>
- Champigneulle B, Davranche K, Brugniaux JV et al (2022) Effect of a speed ascent to the top of Europe on cognitive function in elite climbers. *Eur J Appl Physiol*. <https://doi.org/10.1007/s00421-021-04855-6>
- Chan J, Edwards NFA, Khandheria BK et al (2019) A new approach to assess myocardial work by non-invasive left ventricular pressure–strain relations in hypertension and dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J - Cardiovasc Imaging* 20:31–39. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jev131>
- Chemla D, Castelain V, Humbert M et al (2004) New formula for predicting mean pulmonary artery pressure using systolic pulmonary artery pressure. *Chest* 126:1313–1317. <https://doi.org/10.1378/chest.126.4.1313>
- Cikes M, Solomon SD (2016) Beyond ejection fraction: an integrative approach for assessment of cardiac structure and function in heart failure. *Eur Heart J* 37:1642–1650. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv510>
- D'Andrea A, Radmilovic J, Carbone A et al (2020) Speckle tracking evaluation in endurance athletes: the “optimal” myocardial work. *Int J Cardiovasc Imaging*. <https://doi.org/10.1007/s10554-020-01871-z>
- Dalla Vecchia L, Traversi E, Porta A et al (2014) On site assessment of cardiac function and neural regulation in amateur half marathon runners. *Open Heart* 1:e000005. <https://doi.org/10.1136/openheart-2013-000005>
- Dávila-Román VG, Guest TM, Tuteur PG et al (1997) Transient right but not left ventricular dysfunction after strenuous exercise at high altitude. *J Am Coll Cardiol* 30:468–473. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(97\)00179-4](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(97)00179-4)
- De Boeck BW, Toma A, Kiencke S et al (2018) Altered left ventricular geometry and torsional mechanics in high altitude-induced pulmonary hypertension: a three-dimensional echocardiographic study. *J Am Soc Echocardiogr* 31:314–322. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2017.12.001>
- Dill DB, Costill DL (1974) Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol* 37:247–248. <https://doi.org/10.1152/jappl.1974.37.2.247>
- Duc S, Cassirame J, Durand F (2011) Physiology of ski mountaineering racing. *Int J Sports Med* 32:856–863. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1279721>
- Elliott AD, La Gerche A (2015) The right ventricle following prolonged endurance exercise: are we overlooking the more important side of the heart? A meta-analysis. *Br J Sports Med* 49:724–729. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2014-093895>
- Fornasiero A, Savoldelli A, Fruet D et al (2018) Physiological intensity profile, exercise load and performance predictors of a 65-km mountain ultra-marathon. *J Sports Sci* 36:1287–1295. <https://doi.org/10.1080/02640414.2017.1374707>
- Fornasiero A, Zignoli A, Rakobowchuk M et al (2021) Post-exercise cardiac autonomic and cardiovascular responses to heart rate-matched and work rate-matched hypoxic exercise. *Eur J Appl Physiol* 121:2061–2076. <https://doi.org/10.1007/s00421-021-04678-5>
- Forsythe L, George K, Oxborough D (2018) Speckle tracking echocardiography for the assessment of the athlete's heart: is it ready for daily practice? *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 20:83. <https://doi.org/10.1007/s11936-018-0677-0>
- Hackett PH, Roach RC (2001) High-altitude illness. *N Engl J Med* 345:107–114. <https://doi.org/10.1056/NEJM200107123450206>
- Halliwill JR, Buck TM, Laceywell AN, Romero SA (2013) Postexercise hypotension and sustained postexercise vasodilatation: what happens after we exercise? *Exp Physiol* 98:7–18. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.058065>
- Hubert A, Le Rolle V, Leclercq C et al (2018) Estimation of myocardial work from pressure–strain loops analysis: an experimental evaluation. *Eur Heart J - Cardiovasc Imaging* 19:1372–1379. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jev024>
- Keogh E, Chakrabarti K, Pazzani M, Mehrotra S (2001) Dimensionality reduction for fast similarity search in large time series databases. *Knowl Inf Syst* 3:263–286. <https://doi.org/10.1007/PL00011669>
- La Gerche A, Heidbüchel H, Burns AT et al (2011) Disproportionate exercise load and remodeling of the athlete's right ventricle. *Med Sci Sports Exerc* 43:974–981. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31820607a3>
- Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V et al (2015) Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American society of echocardiography and the European association of cardiovascular imaging. *Eur Heart J - Cardiovasc Imaging* 16:233–271. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jev014>
- Lord RN, Utomi V, Oxborough DL et al (2018) Left ventricular function and mechanics following prolonged endurance exercise: an update and meta-analysis with insights from novel techniques. *Eur J Appl Physiol* 118:1291–1299. <https://doi.org/10.1007/s00421-018-3906-z>
- Manganaro R, Marchetta S, Dulgheru R et al (2020) Correlation between non-invasive myocardial work indices and main parameters of systolic and diastolic function: results from the EACVI

- NORRE study. *Eur Heart J - Cardiovasc Imaging* 21:533–541. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jez203>
- Maufrais C, Rupp T, Bouzat P et al (2017) Heart mechanics at high altitude: 6 days on the top of Europe. *Eur Heart J - Cardiovasc Imaging* 18:1369–1377. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jew286>
- Maufrais C, Rupp T, Bouzat P et al (2019) Medex 2015: the key role of cardiac mechanics to maintain biventricular function at high altitude. *Exp Physiol* 104:667–676. <https://doi.org/10.1113/EP087350>
- Millet GP, Jornet K (2019) On top to the top—acclimatization strategy for the “fastest known time” to Mount Everest. *Int J Sports Physiol Perform* 14:1438–1441. <https://doi.org/10.1123/ijspp.2018-0931>
- Mourot L (2018) Limitation of maximal heart rate in hypoxia: mechanisms and clinical importance. *Front Physiol* 9:972. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00972>
- Naeije R (2010) Physiological adaptation of the cardiovascular system to high altitude. *Prog Cardiovasc Dis* 52:456–466. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2010.03.004>
- Nagueh SF, Smiseth OA, Appleton CP et al (2016) Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography: an update from the American society of echocardiography and the European association of cardiovascular imaging. *Eur Heart J - Cardiovasc Imaging* 17:1321–1360. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jew082>
- Neumayr G (2004) Effect of ultramarathon cycling on the heart rate in elite cyclists. *Br J Sports Med* 38:55–59. <https://doi.org/10.1136/bjsm.2002.003707>
- Pinsky MR (2020) Dynamic right and left ventricular interactions in the pig. *Exp Physiol* 105:1293–1315. <https://doi.org/10.1113/EP088550>
- Puthon L, Bouzat P, Rupp T et al (2016) Physiological characteristics of elite high-altitude climbers: climbers in hypoxia. *Scand J Med Sci Sports* 26:1052–1059. <https://doi.org/10.1111/sms.12547>
- Roach RC, Hackett PH, Oelz O et al (2018) The 2018 lake Louise acute mountain sickness score. *High Alt Med Biol* 19:4–6. <https://doi.org/10.1089/ham.2017.0164>
- Robach P, Boisson R-C, Vincent L et al (2014) Hemolysis induced by an extreme mountain ultra-marathon is not associated with a decrease in total red blood cell volume. *Scand J Med Sci Sports* 24:18–27. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2012.01481.x>
- Rudski LG, Lai WW, Afilalo J et al (2010) Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American society of echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 23:685–713. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2010.05.010>
- Rupp T, Jubeau M, Millet GY et al (2013) The effect of hypoxemia and exercise on acute mountain sickness symptoms. *J Appl Physiol* 114:180–185. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00769.2012>
- Russell K, Eriksen M, Aaberge L et al (2012) A novel clinical method for quantification of regional left ventricular pressure–strain loop area: a non-invasive index of myocardial work. *Eur Heart J* 33:724–733. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs016>
- Sengupta S, Jain R, Burkule N et al (2020) Myocardial work index: a novel method for assessment of myocardial function in South Asian recreational athletes. *J Patient-Cent Res Rev* 7:147–156. <https://doi.org/10.17294/2330-0698.1730>
- Siebenmann C, Robach P, Lundby C (2017) Regulation of blood volume in lowlanders exposed to high altitude. *J Appl Physiol* 123:957–966. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00118.2017>
- Simpson LL, Steinback CD, Stembridge M, Moore JP (2021) A sympathetic view of blood pressure control at high altitude: new insights from microneurographic studies. *Exp Physiol* 106:377–384. <https://doi.org/10.1113/EP089194>
- Smiseth OA, Torp H, Opdahl A et al (2016) Myocardial strain imaging: how useful is it in clinical decision making? *Eur Heart J* 37:1196–1207. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv529>
- Sørensen J, Harms HJ, Aalen JM et al (2020) Myocardial efficiency: a fundamental physiological concept on the verge of clinical impact. *JACC Cardiovasc Imaging* 13:1564–1576. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2019.08.030>
- Stembridge M, Ainslie PN, Hughes MG et al (2015) Impaired myocardial function does not explain reduced left ventricular filling and stroke volume at rest or during exercise at high altitude. *J Appl Physiol* 119:1219–1227. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00995.2014>
- Tadic M, Cuspidi C, Pencic B et al (2021) Association between myocardial work and functional capacity in patients with arterial hypertension: an echocardiographic study. *Blood Press* 30:188–195. <https://doi.org/10.1080/08037051.2021.1902267>
- Tokodi M, Oláh A, Fábíán A et al (2021) Novel insights into the athlete’s heart: is myocardial work the new champion of systolic function? *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jeab162>
- Williams N (2017) The Borg rating of perceived exertion (RPE) scale. *Occup Med* 67:404–405. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqx063>

**Publisher’s Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Article

# Validation of Noninvasive Assessment of Pulmonary Gas Exchange in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease during Initial Exposure to High Altitude

Benoit Champigneulle <sup>1,2,\*</sup> , Lukas Reinhard <sup>3,4,5</sup>, Maamed Mademilov <sup>4,5,6</sup>, Mathieu Marillier <sup>1</sup>, Tanja Ulrich <sup>3,4,5</sup>, Arcangelo F. Carta <sup>3,4,5</sup>, Philipp Scheiwiller <sup>3,4,5</sup>, Saltanat B. Shabykeeva <sup>4,5,6</sup>, Ulan U. Sheraliev <sup>4,5,6</sup>, Ainura K. Abdraeva <sup>4,5,6</sup>, Kamila M. Magdieva <sup>4,5,6</sup>, Gulzada Mirzalieva <sup>4,5,6</sup>, Aijan T. Taalaibekova <sup>4,5,6</sup>, Aigul K. Ozonova <sup>4,5,6</sup>, Aidai O. Erkinbaeva <sup>4,5,6</sup>, Nurdin U. Shakiev <sup>4,5,6</sup>, Syimyk A. Azizbekov <sup>4,5,6</sup>, Philip N. Ainslie <sup>7</sup>, Talant M. Sooronbaev <sup>4,5,6</sup>, Silvia Ulrich <sup>3,4,5</sup> , Konrad E. Bloch <sup>3,4,5</sup> , Samuel Verges <sup>1,†</sup> and Michael Furian <sup>1,3,4,5,†</sup>

- <sup>1</sup> HP2 Laboratory, INSERM U1300, Grenoble Alpes University, CHU Grenoble Alpes, 38400 Grenoble, France
  - <sup>2</sup> Department of Anesthesia and Critical Care, Grenoble Alpes University Hospital, 38043 Grenoble, France
  - <sup>3</sup> Department of Pulmonology, University Hospital Zürich, 8091 Zurich, Switzerland
  - <sup>4</sup> Swiss-Kyrgyz High-Altitude Medicine and Research Initiative, 8091 Zurich, Switzerland
  - <sup>5</sup> Swiss-Kyrgyz High-Altitude Medicine and Research Initiative, Bishkek 720040, Kyrgyzstan
  - <sup>6</sup> Department of Respiratory Medicine, National Center for Cardiology and Internal Medicine, Bishkek 720040, Kyrgyzstan
  - <sup>7</sup> Centre for Heart, Lung and Vascular Health, School of Health and Exercise Sciences, University of British Columbia Okanagan, Kelowna, BC V1V 1V7, Canada
- \* Correspondence: bchampigneulle@chu-grenoble.fr  
 † These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Champigneulle, B.; Reinhard, L.; Mademilov, M.; Marillier, M.; Ulrich, T.; Carta, A.F.; Scheiwiller, P.; Shabykeeva, S.B.; Sheraliev, U.U.; Abdraeva, A.K.; et al. Validation of Noninvasive Assessment of Pulmonary Gas Exchange in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease during Initial Exposure to High Altitude. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 795. <https://doi.org/10.3390/jcm12030795>

Academic Editors: Enrico M. Clini and Emmanuel Andrés

Received: 30 November 2022  
 Revised: 9 January 2023  
 Accepted: 13 January 2023  
 Published: 19 January 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Investigation of pulmonary gas exchange efficacy usually requires arterial blood gas analysis (aBGA) to determine arterial partial pressure of oxygen (mPaO<sub>2</sub>) and compute the Riley alveolar-to-arterial oxygen difference (A-aDO<sub>2</sub>); that is a demanding and invasive procedure. A noninvasive approach (AGM100), allowing the calculation of PaO<sub>2</sub> (cPaO<sub>2</sub>) derived from pulse oximetry (SpO<sub>2</sub>), has been developed, but this has not been validated in a large cohort of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. Our aim was to conduct a validation study of the AG100 in hypoxemic moderate-to-severe COPD. Concurrent measurements of cPaO<sub>2</sub> (AGM100) and mPaO<sub>2</sub> (EPOC, portable aBGA device) were performed in 131 moderate-to-severe COPD patients (mean ±SD FEV<sub>1</sub>: 60 ± 10% of predicted value) and low-altitude residents, becoming hypoxemic (i.e., SpO<sub>2</sub> < 94%) during a short stay at 3100 m (Too-Ashu, Kyrgyzstan). Agreements between cPaO<sub>2</sub> (AGM100) and mPaO<sub>2</sub> (EPOC) and between the O<sub>2</sub>-deficit (calculated as the difference between end-tidal pressure of O<sub>2</sub> and cPaO<sub>2</sub> by the AGM100) and Riley A-aDO<sub>2</sub> were assessed. Mean bias (±SD) between cPaO<sub>2</sub> and mPaO<sub>2</sub> was 2.0 ± 4.6 mmHg (95% Confidence Interval (CI): 1.2 to 2.8 mmHg) with 95% limits of agreement (LoA): −7.1 to 11.1 mmHg. In multivariable analysis, larger body mass index ( $p = 0.046$ ), an increase in SpO<sub>2</sub> ( $p < 0.001$ ), and an increase in PaCO<sub>2</sub>-PETCO<sub>2</sub> difference ( $p < 0.001$ ) were associated with imprecision (i.e., the discrepancy between cPaO<sub>2</sub> and mPaO<sub>2</sub>). The positive predictive value of cPaO<sub>2</sub> to detect severe hypoxemia (i.e., PaO<sub>2</sub> ≤ 55 mmHg) was 0.94 (95% CI: 0.87 to 0.98) with a positive likelihood ratio of 3.77 (95% CI: 1.71 to 8.33). The mean bias between O<sub>2</sub>-deficit and A-aDO<sub>2</sub> was 6.2 ± 5.5 mmHg (95% CI: 5.3 to 7.2 mmHg; 95%LoA: −4.5 to 17.0 mmHg). AGM100 provided an accurate estimate of PaO<sub>2</sub> in hypoxemic patients with COPD, but the precision for individual values was modest. This device is promising for noninvasive assessment of pulmonary gas exchange efficacy in COPD patients.

**Keywords:** gas exchange; O<sub>2</sub> deficit; noninvasive measurement; COPD; validation; AGM100

## 1. Introduction

In clinical practice, sampling arterial blood to measure the partial pressures of oxygen (PaO<sub>2</sub>) and carbon dioxide (PaCO<sub>2</sub>) remains a keystone to investigating pulmonary gas exchange abnormalities [1]. Additionally, using the Riley ideal alveolar partial pressure of oxygen (PAO<sub>2</sub>) equation [2], the traditional alveolar-to-arterial oxygen difference (A-aDO<sub>2</sub>) can be calculated [3]. This approach is, for instance, helpful to assess and follow up over time the decline of gas exchange accountable for diffusion or ventilation-to-perfusion ratio ( $\dot{V}_A/\dot{Q}$ ) impairments in patients with chronic lung diseases [4,5]. Furthermore, for these patients, the PaO<sub>2</sub> value may lead to therapeutic decisions such as long-term oxygen therapy [6]. However, this traditional assessment strategy has some disadvantages: arterial puncture often remains a painful experience for patients, and puncture failure is not unusual [7]. Arterial blood gas analysis (aBGA) also requires expensive analyzers and trained operators, which is not compatible with an easy pulmonary gas exchange assessment outside hospital facilities. Thus, well-validated, reproducible, and easy-to-perform gas exchange assessment options are currently lacking [8].

Recently, a non-invasive approach for measuring the pulmonary gas exchange has been developed and commercialized (AGM100™, MediPines Corp., Yorba Linda, CA, USA). AGM100 requires sampling partial pressure of end-tidal oxygen (PETO<sub>2</sub>) and carbon dioxide (PETCO<sub>2</sub>) during quiet and steady breathing (thus reflecting intra-alveolar values); the PaO<sub>2</sub> is calculated (cPaO<sub>2</sub>) from oxygen saturation measured through a pulse oximeter (SpO<sub>2</sub>) using the oxygen–hemoglobin dissociation curve with a PaCO<sub>2</sub>-shift-correction based on PETCO<sub>2</sub> values [9,10]. This approach allows the computation of the O<sub>2</sub> deficit, defined as the difference between alveolar PO<sub>2</sub> and cPaO<sub>2</sub>, which has been suggested to be a reliable surrogate of the conventional A-aDO<sub>2</sub> and  $\dot{V}_A/\dot{Q}$  mismatch [11]. This O<sub>2</sub> deficit has been shown indeed to strongly correlate with the conventional A-aDO<sub>2</sub> in hypoxemic patients [12] and in healthy volunteers exercising in a hypoxic environment [13]. Moreover, the O<sub>2</sub> deficit is elevated with normal ageing and augmented in patients with lung diseases when compared to healthy young volunteers [14,15]. Furthermore, the cPaO<sub>2</sub> has been shown to be a valid estimation of the measured PaO<sub>2</sub> (mPaO<sub>2</sub>) in healthy, hypoxic subjects achieving a progressive cycling test in normobaric hypoxia [13].

This new and non-invasive pulmonary gas exchange measurement may thus represent a promising method for the assessment of gas exchange impairment [8,11]. One small validation study ( $n = 23$ ) reported a mean bias of  $-4$  mmHg between cPaO<sub>2</sub> and mPaO<sub>2</sub> in a heterogeneous group of patients [12]. However, validation data and insights into the accuracy of such non-invasive measurements in particular are currently lacking in a large and homogenous population of patients suffering from chronic lung diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD). COPD is a highly prevalent disease and represents the third leading cause of death worldwide [16,17]. In these patients, disease progression gradually leads to hypoxemia, mainly through  $\dot{V}_A/\dot{Q}$  impairments [18], which requires regular follow-up of pulmonary gas exchange efficiency, including aBGA [4,5,16].

Therefore, the aim of this diagnostic accuracy study was to compare the cPaO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> deficit obtained from the AGM100 to PaO<sub>2</sub> and A-aDO<sub>2</sub> obtained and calculated from aBGA in a homogenous population of COPD patients becoming hypoxemic during a short high-altitude sojourn.

## 2. Methods

### 2.1. Study Design and Participants

This study was conducted within a large research project conducted in Kyrgyzstan in 2021, which involved stable, moderate-to-severe COPD patients exposed to a high-altitude environment (High Altitude Clinic, Too-Ashu, 3100 m) during a 2-day period ([ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03957759) NCT03957759 and NCT04913389). The study was approved by the Ethics Committee of the National Center for Cardiology and Internal Medicine (01-2021, Bishkek, Kyrgyzstan) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All participants were fully informed in their native language and provided a written consent.

Participants included were patients aged between 35 and 75 years, with stable, moderate-to-severe COPD diagnosed according to the Global initiative for Obstructive Lung Disease (GOLD) guidelines [16] with a forced expiratory volume in the first second of expiration (FEV<sub>1</sub>) between 40 and 80% of predicted value and a resting SpO<sub>2</sub> < 94% at 3100 m. All patients were living at low altitude (<1000 m) and free of other unstable comorbidities.

## 2.2. Experimental Protocol

All measurements were conducted in a supine, bedrest position with the head at 10–20°. No position change was allowed between the AGM100 measurement and the arterial puncture. Measurements were conducted at different time points while patients were exposed to a hypobaric environment at 3100 m: (1) at 6:00 AM after the first night at 3100 m while patients were awake but still in bed or (2) in patients who prematurely, i.e., before the first night at high altitude, experienced an altitude-related adverse health effect (ARAHE, a composite criterion including a severe hypoxemia defined as resting SpO<sub>2</sub> < 80% over 30 min or a resting SpO<sub>2</sub> < 75% over 15 min) [19]. In case of an ARAHE, AGM100 measurement and aBGA were performed before starting oxygen therapy or after stopping oxygen therapy for at least 20 min. Procedures were standardized as follows:

- Non-invasive AGM100 measurement was first performed: participants were asked to breathe through a mouthpiece (with a nose clip) to record PETO<sub>2</sub> and PETCO<sub>2</sub>, while SpO<sub>2</sub> was continuously measured with a finger pulse oximeter, connected to the device. After automatic detection of a breathing steady-state, the measurement was automatically stopped and values for SpO<sub>2</sub>, PETO<sub>2</sub>, and PETCO<sub>2</sub> were recorded, and the cPaO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> deficit were calculated [10,11].
- Immediately after the AGM100 measurement, an arterial blood sample was collected by radial artery puncture while participants were breathing ambient air. Each sample was analyzed using a point-of-care blood gas analyzer (EPOC®, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, and arterial pH were analyzed. The EPOC has been previously validated in a high-altitude environment [20].

Using the mPaO<sub>2</sub> from the EPOC, the conventional A-aDO<sub>2</sub> was calculated [1]. Calculated PAO<sub>2</sub> (cPAO<sub>2</sub>) was obtained using the alveolar gas equation [3]:  $cPAO_2 = FiO_2 \times (P_{Atm} - P_{H_2O}) - \frac{PaCO_2}{RER} \times [1 - FiO_2 \times (1 - RER)]$  where the respiratory exchange ratio (RER) was assumed to be equal to 0.8; P<sub>Atm</sub> represents the atmospheric pressure; and P<sub>H<sub>2</sub>O</sub> represents the saturated water vapor pressure at 37 °C (47 mmHg).

## 2.3. Clinical Assessment

For each patient, the medical history was obtained, and a clinical examination was performed prior to the inclusion in the main study at low altitude (Bishkek, Kyrgyzstan, 760 m). At the same time, spirometry was performed to confirm the airflow obstruction and COPD severity according to standard guidelines [21]. Severity of COPD was classified according to the GOLD grade [16]. Assessment of breathlessness and life-impact of COPD were evaluated using the modified British medical research council (mMRC) and the COPD assessment test (CAT) scores [16].

## 2.4. Outcomes

The main outcome of this validation study was the accuracy and precision of cPaO<sub>2</sub> (AGM100) in comparison to mPaO<sub>2</sub> (EPOC). Secondary outcomes included the identification of factors associated with the imprecision of the cPaO<sub>2</sub> estimation, the diagnostic performance of the AGM100 to detect a predefined severe resting hypoxemia, and the agreement between the O<sub>2</sub> deficit (AGM100) and the A-aDO<sub>2</sub> (EPOC).

### 2.5. Statistical Analysis

Data reporting: continuous variables are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or median (25–75th percentiles) as appropriate. Categorical variables were reported in numbers and percentages (%).

Agreement analysis between AGM100 and EPOC: agreement between cPaO<sub>2</sub> (AGM100) and mPaO<sub>2</sub> (EPOC), between PETCO<sub>2</sub> (AGM100) and mPaCO<sub>2</sub> (EPOC), and between O<sub>2</sub> deficit (AGM100) and A-aDO<sub>2</sub> (EPOC) were assessed using linear regression analyses, computation of Pearson correlation coefficients, and Bland–Altman plotting [22]. As an estimate of accuracy, mean bias  $\pm$  SD with 95% confidence interval (CI) was calculated; as an estimate of precision, the upper and lower limits of agreements (LOA) were computed [23]. The possibility of a proportional bias was evaluated using a linear regression analysis on the Bland–Altman plot [23]. Bland–Altman was plotted considering the absolute difference against the mean value for PaO<sub>2</sub>, whereas absolute difference between O<sub>2</sub> deficit and A-aDO<sub>2</sub> was plotted against A-aDO<sub>2</sub>, considering A-aDO<sub>2</sub> as the “gold standard” [24]. Furthermore, as PETCO<sub>2</sub> is used as a surrogate of PaCO<sub>2</sub> to correct the cPaO<sub>2</sub> from SpO<sub>2</sub> [9, 10], agreement between the two values was also assessed using both linear regression and Bland–Altman plotting.

Sensitivity analysis: since aBGA point-of-care devices as EPOC may not be considered as accurate as stationary devices, we conducted a sensitivity analysis for PaO<sub>2</sub> and A-aDO<sub>2</sub> agreements, using a corrected value of mPaO<sub>2</sub> computed from the regression equation developed in a previous validation study of the EPOC, conducted in similar field conditions [20].

Multivariable regression analysis: to assess confounding factors that may explain a discrepancy between cPaO<sub>2</sub> and mPaO<sub>2</sub>, we performed a multivariable regression analysis, considering the difference between the two values as the dependent variable and age, sex, body mass index, SpO<sub>2</sub>, and time delay between the two measurements and PaCO<sub>2</sub>-PETCO<sub>2</sub> gradient as potential explanatory variables. A parsimonious model was built using a backward stepwise elimination of the most non-significant variables; therefore, the only significant explanatory variables were retained in the final model.

Diagnosis performance: the predictive performance of the AGM100 to detect pre-defined severe resting hypoxemia of PaO<sub>2</sub> < 60 mmHg and PaO<sub>2</sub>  $\leq$  55 mmHg (versus EPOC mPaO<sub>2</sub>) was investigated by computation of the sensitivity (Sn), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and positive likelihood ratio (LR+). Both hypoxemia thresholds are commonly admitted for home oxygen therapy in COPD [6].

All tests were two-sided, and a *p*-value < 0.05 or a 95% CI excluding zero was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using R software (version 4.1.2, The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) and GraphPad Prism (version 9.3.1, GraphPad Software, Boston, MA, USA).

## 3. Results

### 3.1. Measurements and Patients Included in the Study

During the study period, 153 single AGM100 measurements were performed in 153 COPD patients sojourning at 3100 m. Among them, 12 were not paired with an aBGA due to arterial puncture failures (*n* = 12, 8% failure rate), and 10 measurements were excluded from the analysis due to a SpO<sub>2</sub>  $\geq$  94% at the time of measurement. Thus, 131 paired AGM100-EPOC measurements obtained from 131 COPD patients were included in the analysis. Among them, 110 measurements (84%) were preplanned measurements (i.e., conducted at 06:00 AM after the first night at 3100 m), whereas 21 measurements (16%) were non-planned measurements performed when experiencing an ARAHE (mostly isolated severe hypoxemia). A steady-state was automatically reached in 65 (60–81) seconds, for all, except one, measurements. Median delay between the end of the AGM100 measurement and the arterial puncture was 217 (153–384) seconds, and aBGA was performed at 163 (109–285) seconds after the arterial puncture. Mean SpO<sub>2</sub> at the time of the AGM100

measurement was  $87 \pm 4\%$  (range: 74 to 93%). Demographic characteristics of the patients are presented in the Table 1.

**Table 1.** Participant characteristics.

	COPD Participants (n = 131)
Sex	
Men	70 (53%)
Women	61 (47%)
Age (years)	60 (53–65)
Body mass index (kg·m <sup>-2</sup> )	27.9 ± 4.0
Baseline SpO <sub>2</sub> (%) at 760 m	95 ± 2
FEV <sub>1</sub> (% predicted value)	60 ± 10
GOLD grade <sup>a</sup>	
2	112 (85%)
3	19 (15%)
Smoking status <sup>b</sup>	
Active smoker	20 (16%)
Ex-smoker	42 (34%)
Never smoke	62 (50%)
Smoking, pack-years	18 (8–40)
mMRC dyspnea score	1 (1–2)
CAT score	5 (3–9)
Comorbidities	
Hypertension	20 (15%)
Coronary artery disease	0 (0%)
Diabetes	4 (3%)
Others	13 (10%)
Pulmonary medication	
Inhaled beta-adrenergics	25 (19%)
Inhaled anticholinergics	51 (39%)
Inhaled corticosteroids	24 (18%)

Data are reported in mean ± SD, median (25–75th percentiles) or number (%) as appropriate. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; SpO<sub>2</sub>, oxygen saturation assessed by finger oximetry; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in the first second of expiration; GOLD, Global initiative for chronic obstructive lung disease; mMRC, modified British medical research council; CAT, COPD assessment test. <sup>a</sup> GOLD grade 2, moderate COPD: post-bronchodilator FEV<sub>1</sub>/FVC < 0.7, FEV<sub>1</sub>: 50 to 79% predicted value; GOLD grade 3, severe COPD: FEV<sub>1</sub>/FVC < 0.7, FEV<sub>1</sub>: 30 to 49% predicted value. <sup>b</sup> Data are missing for seven patients.

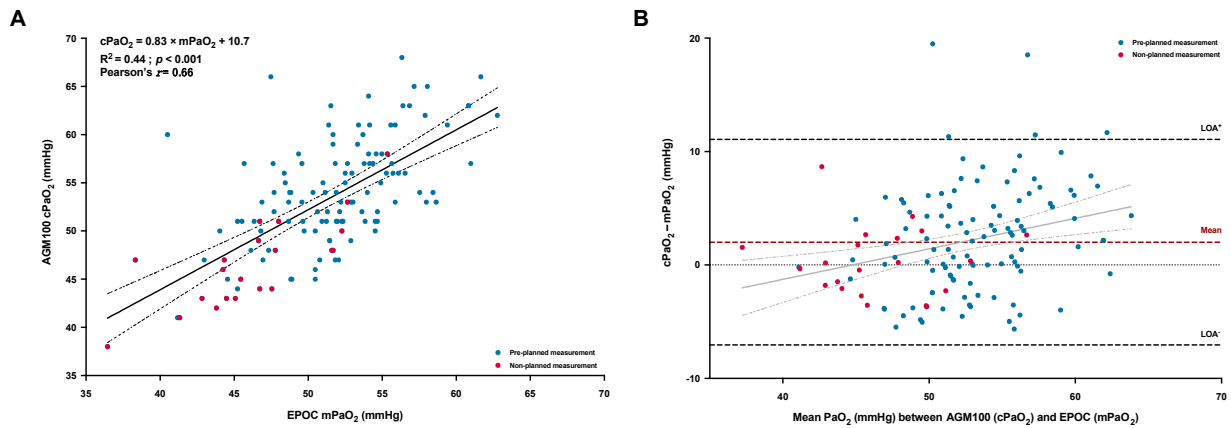
### 3.2. PaO<sub>2</sub> Agreement between cPaO<sub>2</sub> (AGM100) and mPaO<sub>2</sub> (EPOC)

A moderate but significant correlation was observed between cPaO<sub>2</sub> and mPaO<sub>2</sub> (Figure 1A). Furthermore, the two methods showed good accuracy with a low mean positive bias, albeit significant (Figure 1B and Table 2), but a low precision according to the large variability (Figure 1B and Table 2). Linear regression analysis (Figure 1B) highlighted a proportional bias, which increased with higher values of PaO<sub>2</sub> (*p* = 0.004). Sensitivity analysis using the corrected mPaO<sub>2</sub> (Table 2) did not show any improvement in agreement between the two values, with a low mean negative bias.

**Table 2.** Agreement among parameters derived from the AGM100 and EPOC devices.

Compared Variables	Mean Bias ± SD (mmHg)	95% CI Mean Bias (mmHg)	LOA (mmHg)
cPaO <sub>2</sub> vs. mPaO <sub>2</sub>	2.0 ± 4.6	1.2 to 2.8	−7.1 to 11.1
cPaO <sub>2</sub> vs. mPaO <sub>2</sub> corrected <sup>a</sup>	−2.3 ± 4.6	−3.1 to −1.5	−11.3 to 6.6
O <sub>2</sub> deficit vs. A-aDO <sub>2</sub>	6.2 ± 5.5	5.3 to 7.2	−4.5 to 17.0
O <sub>2</sub> deficit vs. A-aDO <sub>2</sub> corrected <sup>a</sup>	10.6 ± 5.5	9.6 to 11.5	−0.2 to 21.4

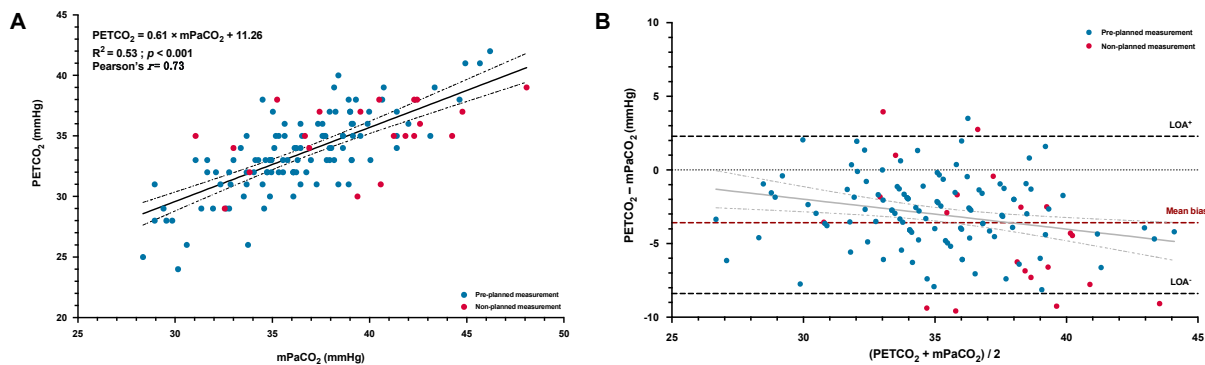
cPaO<sub>2</sub>, calculated arterial oxygen partial pressure (AGM100); mPaO<sub>2</sub>, measured arterial oxygen partial pressure (EPOC); SpO<sub>2</sub>, pulse oxygen saturation; O<sub>2</sub> deficit, oxygen deficit (AGM100); A-aDO<sub>2</sub>, alveolar-to-arterial oxygen gradient (EPOC); SD, standard deviation; CI, confidence interval; LOA, limits of agreement. <sup>a</sup> mPaO<sub>2</sub> obtained from the EPOC was corrected using the following equation: PaO<sub>2</sub> corrected = 9.45 + mPaO<sub>2</sub> × 0.90<sup>20</sup>.



**Figure 1.** Linear regression and correlation (A) between the measured arterial PaO<sub>2</sub> (mPaO<sub>2</sub>) with the portable blood gas analyzer (EPOC) and the calculated PaO<sub>2</sub> (cPaO<sub>2</sub>) provided by the AGM100 device; the solid and dashed lines represent the regression line with the 95% confident interval limits. Bland–Altman plot of agreement (B) between the cPaO<sub>2</sub> and the mPaO<sub>2</sub>, expressed as absolute differences vs. the mean of both measurements; the dashed lines represent the mean bias (in red) and the 95% limits of agreement (LOA, in black). Individual values were identified as pre-planned measurement (early morning after a first night at high altitude, blue solid circles) or as non-planned measurement (occurrence of an early altitude-related adverse health effect, red solid circles).

3.3. Agreement between PETCO<sub>2</sub> (AGM100) and PaCO<sub>2</sub> (EPOC)

A moderate and significant correlation was shown between the mPaCO<sub>2</sub> and the PETCO<sub>2</sub> (Figure 2A). Bland–Altman analysis (Figure 2B) among the two variables highlighted a low and significant mean bias of  $-3.1 \pm 2.7$  mmHg (95% CI,  $-3.5$  to  $-2.6$  mmHg), which increased with higher values of PaCO<sub>2</sub> ( $p = 0.004$ ).



**Figure 2.** Linear regression and correlation (A) between the measured arterial PaCO<sub>2</sub> (mPaCO<sub>2</sub>) with the portable blood gas analyzer (EPOC) and the end-tidal CO<sub>2</sub> (PETCO<sub>2</sub>) obtained from the AGM100; the solid and dashed lines represent the regression line with the 95% confident interval limits. Bland–Altman plot of agreement (B) between the PETCO<sub>2</sub> and the mPaCO<sub>2</sub>, plotted as absolute differences vs. the mean of both measurements; the dashed lines represent the mean bias (in red) and the 95% limits of agreement (LOA, in black). Individual values were identified as pre-planned measurement (early morning after a first night at high altitude, blue solid circles) or as non-planned measurement (occurrence of an early altitude-related adverse health effect, red solid circles).

3.4. Factors Associated with the Accuracy of the cPaO<sub>2</sub> and Diagnosis Performance

Multivariable linear analysis including both demographic and procedural factors (Table 3) highlighted that the increase in body mass index and in PaCO<sub>2</sub>-PETCO<sub>2</sub> gradient

were positively associated with an increase in discrepancy between cPaO<sub>2</sub> and mPaO<sub>2</sub>. Conversely, lower SpO<sub>2</sub> were independently associated with a better accuracy (i.e., a lower absolute difference) between cPaO<sub>2</sub> and mPaO<sub>2</sub>. When considering the predictive diagnosis performance (Table 4), the AGM100 device showed a high PPV to detect a severe resting hypoxemia for both considered thresholds of PaO<sub>2</sub>.

**Table 3.** Multivariable linear analysis of factors associated with the discrepancy between cPaO<sub>2</sub> and mPaO<sub>2</sub>.

Dependent Variable: cPaO <sub>2</sub> -mPaO <sub>2</sub> , mmHg	Full Model			Final Model		
	β-Coefficient	SE	p Value	β-Coefficient	SE	p Value
Intercept	−63.56	11.29	<0.001	−65.67	8.86	<0.001
Age, years	0.01	0.05	0.83	−	−	−
Male sex (vs. female)	−0.92	0.79	0.25	−	−	−
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	0.11	0.10	0.28	0.18	0.09	0.046
Baseline FEV <sub>1</sub> (% predicted value) at 760 m	−2.66	3.78	0.48	−	−	−
SpO <sub>2</sub> , %	0.72	0.12	<0.001	0.70	0.10	<0.001
Time delay between end of AGM100 measurement and ABG puncture, sec	−0.001	0.002	0.54	−	−	−
PaCO <sub>2</sub> -PETCO <sub>2</sub> difference, mmHg	0.53	0.16	0.002	0.47	0.13	<0.001

The final model was obtained after backward elimination of the non-significant variables ( $p > 0.05$ ) from the full model. cPaO<sub>2</sub>, calculated arterial oxygen partial pressure (AGM100 device); mPaO<sub>2</sub>, measured arterial oxygen partial pressure (EPOC device); SpO<sub>2</sub>, oxygen saturation assessed by finger oximetry; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in the first second of expiration; PaCO<sub>2</sub>, partial pressure of arterial carbon dioxide; PETCO<sub>2</sub>, partial pressure of end-tidal carbon dioxide.

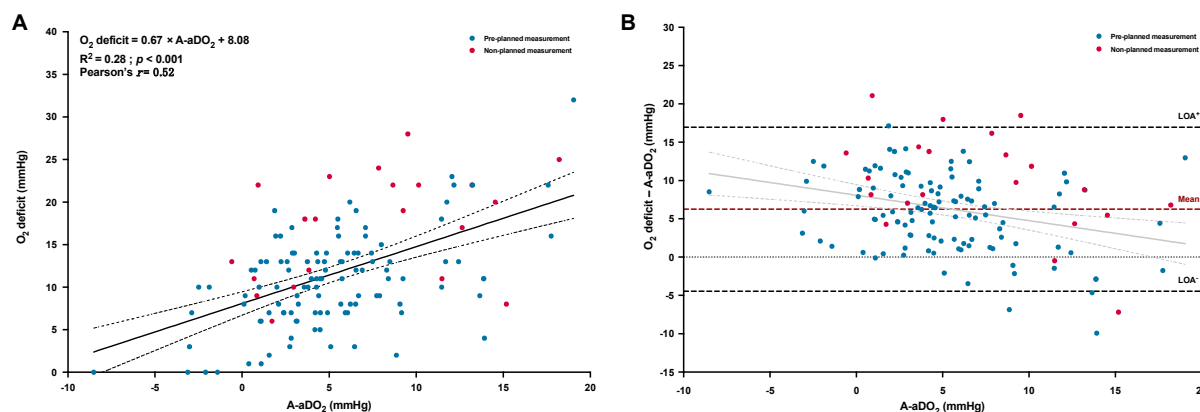
**Table 4.** Diagnostic accuracy of the AGM100 device to diagnose severe resting hypoxemia in COPD.

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	LR+
PaO <sub>2</sub> ≤ 55 mmHg	0.75 (0.66 to 0.83)	0.80 (0.59 to 0.93)	0.94 (0.87 to 0.98)	0.43 (0.29 to 0.59)	3.77 (1.71 to 8.33)
PaO <sub>2</sub> < 60 mmHg	0.86 (0.78 to 0.91)	0.80 (0.28 to 0.99)	0.99 (0.95 to 1.00)	0.18 (0.05 to 0.40)	4.29 (0.74 to 24.77)

Estimates are presented with 95% confidence interval. PaO<sub>2</sub> measurement obtained from aBGA (EPOC device) was considered as the reference test. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; LR+, positive likelihood ratio; PaO<sub>2</sub>, arterial partial pressure of oxygen.

### 3.5. Agreement between O<sub>2</sub> Deficit and A-aDO<sub>2</sub>

Patients exhibited larger values for O<sub>2</sub> deficit than for A-aDO<sub>2</sub> (11.8 ± 6.1 vs. 5.5 ± 4.8 mmHg, respectively,  $p < 0.001$ ) that seemed mostly explained by the difference between measured PETO<sub>2</sub> and cPAO<sub>2</sub> (mean difference: 8.2 ± 4.4 mmHg, 95% CI, 7.4 to 8.9 mmHg), rather than by the difference between cPaO<sub>2</sub> and mPaO<sub>2</sub> (mean difference: 2.0 ± 4.6 mmHg, 95% CI, 1.2 to 2.8 mmHg). O<sub>2</sub> deficit showed a moderate but significant correlation with A-aDO<sub>2</sub> (Figure 3A) with a global positive and significant mean bias of 6.2 ± 5.5 mmHg (Table 2 and Figure 3B). Neither O<sub>2</sub> deficit nor A-aDO<sub>2</sub> were significantly correlated with pulmonary function (FEV<sub>1</sub> and FVC, all  $p > 0.05$ ). Sensitivity analysis using the corrected values of mPaO<sub>2</sub> to compute A-aDO<sub>2</sub> (Table 2) led to a larger bias among the two parameters.



**Figure 3.** Linear regression and correlation (A) between the traditional alveolar-to-arterial oxygen difference (A-aDO<sub>2</sub>) and the oxygen deficit (O<sub>2</sub> deficit); the solid and dashed lines represent the regression line with the 95% confident interval limits. Bland–Altman plot of agreement (B) between the O<sub>2</sub> deficit and the A-aDO<sub>2</sub>, plotted as the absolute difference vs. A-aDO<sub>2</sub>; the dashed lines represent the mean bias (in red) and the 95% limits of agreement (LOA, in black). Individual values were identified as pre-planned measurement (early morning after a first night at high altitude, blue solid circles) or as non-planned measurement (occurrence of an early altitude-related adverse health effect, red solid circles).

#### 4. Discussion

Until now, reports of clinical application of the AGM100 remained anecdotal and confined to patients with acute respiratory failure [25,26], mainly due to the novelty of this method. To the best of our knowledge, this research represents the widest validation study of such non-invasive gas exchange assessment method in a homogenous cohort of hypoxemic patients with moderate-to-severe COPD, following a short high-altitude exposure. The main findings indicate the ability of the AGM100 to predict PaO<sub>2</sub> (with an absolute low mean bias of 2 mmHg versus measured PaO<sub>2</sub> with a previously validated point-of-care analyzer [20]) and the satisfying diagnosis predictive performance (Table 4) of this device to diagnose severe resting hypoxemia. Moreover, the AGM100 provides an estimation of the pulmonary gas exchange efficacy through the O<sub>2</sub> deficit. Taken together, these results suggest that this non-invasive method may serve as a tool to investigate gas exchanges in hypoxemic COPD patients. Such option may be particularly relevant when aBGA are not available or fail.

Despite our promising results, some aspects of the agreement between methods need to be discussed. Even though we reported a similar positive mean bias ( $2.0 \pm 4.6$  mmHg) to the one previously reported in a small and heterogenous sample of 23 hypoxemic patients ( $2.7 \pm 7.0$  mmHg) [12], the accuracy reported by Howe et al. [13] in healthy volunteers via an intra-arterial catheter during rest and exercise in hypoxia was slightly better (mean bias of  $1.0 \pm 2.8$  mmHg). Moreover, the precision of the cPaO<sub>2</sub> could probably be improved, as suggested by our results, regarding the high observed dispersion around the mean bias, albeit concordant with previous results [12]. In particular, we identified that the inaccuracy (i.e., the increase in cPaO<sub>2</sub>-mPaO<sub>2</sub> difference) of the measurement was independently associated with the difference between PaCO<sub>2</sub> and PETCO<sub>2</sub>. This statistical relationship may partially explain some errors in the estimated PaO<sub>2</sub>, as the algorithm of the AGM100, considering the Bohr effect, corrects the cPaO<sub>2</sub> using the PETCO<sub>2</sub> [10,11]. Measurement of PETCO<sub>2</sub> in healthy people breathing a hypoxic mixture has been shown to be highly reproducible and can be considered as a reliable surrogate of PaCO<sub>2</sub> [27]. However, the reliability of this estimation may be lower in patients with  $\dot{V}_A/\dot{Q}$  abnormalities such as COPD [28], being even more pronounced at altitude (as reflected by an increase in dead space fraction) [29]. The previously suggested relative inability of the AGM100 to compute

an accurate  $cPaO_2$  in a non-hypoxemic patient (due to the flat portion of the hemoglobin dissociation curve) [9,14,15] was evidenced in our study by the proportional bias (Figure 1B) and by the independent association between greater  $SpO_2$  and larger divergence between  $cPaO_2$  and  $mPaO_2$ . However, as previously emphasized, this technical limitation is, by itself, not a major problem because gas exchange impairments are unlikely in non-hypoxemic subjects [27]. Therefore, according to previous studies [12,14,15], we did not include non-hypoxemic COPD patients ( $SpO_2 \geq 94\%$ ) at the time of the pre-planned aBGA.

The  $O_2$  deficit, promptly computed by the AGM100 from the measured  $PETO_2$  and  $cPaO_2$  may represent another important clinical parameter similar to  $A-aDO_2$  to investigate the underlying mechanisms of hypoxemia [11]. Such alternative may also be a paradigm shift compared to the  $A-aDO_2$ , since  $PaO_2$  and  $PAO_2$  are inversely calculated or measured among the two methods [9,11]. This allows the  $O_2$  deficit option to better consider lung units with high  $\dot{V}_A/\dot{Q}$  ratios compared to the  $A-aDO_2$  [9,11,27]. This may be of particular interest in chronic lung diseases with  $\dot{V}_A/\dot{Q}$  mismatches, especially in patients with COPD and emphysematous phenotype that typically leads to pulmonary areas with high  $\dot{V}_A/\dot{Q}$  ratio [18,30]. Thus, as expected and previously reported, we observed larger values for  $O_2$  deficit than for  $A-aDO_2$  [12,13]. Furthermore, COPD patients included in our study exhibited higher  $O_2$  deficit than healthy young subjects breathing a 12.5%  $O_2$  mixture (corresponding to an elevation of ~3800 m) [15] and older people in similar conditions [31] but remained lower than measured in hospitalized patients [12]. The positive difference between  $O_2$  deficit and  $A-aDO_2$  observed in our study was mainly explained by a larger discrepancy between  $PETO_2$  and  $cPAO_2$  rather than between  $cPaO_2$  and  $mPaO_2$ . This observation indicates that, in our cohort of COPD patients, the ideal  $cPAO_2$  (that did not consider the contribution of the lung units with high  $\dot{V}_A/\dot{Q}$  ratio) underestimated the true mixed value of alveolar  $PO_2$ . Other methodological consideration may include that the alveolar gas equation assumed a resting RER value of 0.8 [3], which was probably underestimated at high altitude, leading to underestimating the “true”  $PAO_2$  value. Thus, this pitfall may also explain the aberrant negative  $A-aDO_2$  values observed (Figure 3A), as also noted in the study conducted by Howe et al. in healthy people [13]. Nevertheless, a significant (but moderate) relationship was still observed between  $O_2$  deficit and  $A-aDO_2$  (Figure 3A) as previously shown [12,13]. We acknowledge, however, that this relationship and exploration of the agreement of  $O_2$  deficit and  $A-aDO_2$  is somewhat limited due to the inclusion of negative values from the  $A-aDO_2$  measures (that are due to technical rather than physiological differences), and  $PaO_2$  and  $PAO_2$  are inversely calculated or measured among the two methods; therefore, unlike  $PaO_2$ , there is no real gold-standard comparison.

Our study has some methodological limitations. One may argue that the two measurements were not conducted simultaneously, and then ventilation and gas exchange may have been altered during this timeframe. However, similar to a previous study [12], this delay was reduced to only a few minutes with no position change to avoid postural gas exchange modifications [32]. Otherwise, we did not exactly assess the skin pigmentation of the participants; that may be an inaccuracy factor in  $SpO_2$  measurement (and so in  $PaO_2$  computation by the AGM100) for the darkest skin tones [33]. However, patients included in the present study, all natives from Kyrgyzstan in Central Asia, had skin tones mostly ranging from fair to moderate-brown skin (type II to IV on the Fitzpatrick scale) that probably did not induce significant  $SpO_2$  misestimations.

Another potential limitation for the transposition of our findings to clinical settings (i.e., the use of the AGM100 for long-term follow-up or acute assessment during COPD exacerbation) is that the primary mechanism of hypoxemia in our study is mainly driven by a decrease in  $PAO_2$  due to the hypobaric environment without any other cause of worsening hypoxemia (mainly involved in acute or chronic decrease in gas exchange efficiency in COPD). However, impairment of gas exchange in patients with COPD exposed to high altitude may also involve diffusion limitation and worsening of pulmonary hypertension [34,35].

## 5. Conclusions

The AGM100 proved a reliable and promising non-invasive method of gas exchange assessment in a large population of hypoxemic patients with moderate-to-severe COPD exposed to high altitude. These findings may be of strong interest for long-term follow-up, repetitive, or acute assessments of pulmonary gas exchange, especially in places where medical resources are limited. Further studies are required to specify the potential usefulness and added clinical value of the non-invasive gas exchange assessment in COPD patients or other chronic respiratory diseases. Especially, the ability of the AGM100 to estimate gas exchange changes over the time versus changes measured by aBGA remains to be investigated.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.C., L.R., P.N.A., S.V. and M.F.; Formal analysis, B.C. and M.M. (Mathieu Marillier); Funding acquisition, S.U., K.E.B., S.V. and M.F.; Investigation, B.C., L.R., M.M. (Maamed Mademilov), T.U., A.F.C., P.S., S.B.S., U.U.S., A.K.A., K.M.M., G.M., A.T.T., A.K.O., A.O.E., N.U.S., S.A.A. and M.F.; Methodology, B.C., P.N.A., S.V. and M.F.; Project administration, T.M.S., S.U., K.E.B., S.V. and M.F.; Resources, M.M. (Maamed Mademilov), P.N.A., T.M.S., S.U., K.E.B. and M.F.; Supervision, B.C., M.M. (Maamed Mademilov), T.M.S., S.U., K.E.B., S.V. and M.F.; Validation, B.C.; Visualization, B.C., L.R., M.M. (Mathieu Marillier), P.N.A. and M.F.; Writing—original draft, B.C., L.R. and M.F.; Writing—review and editing, M.M. (Maamed Mademilov), M.M. (Mathieu Marillier), T.U., A.F.C., P.S., S.B.S., U.U.S., A.K.A., K.M.M., G.M., A.T.T., A.K.O., A.O.E., N.U.S., S.A.A., P.N.A., T.M.S., S.U., K.E.B. and S.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Samuel Vergès is supported by the Grenoble Alpes University foundation, the “Fonds de dotation AGIR pour les maladies chroniques” and by the French National Research Agency (ANR-12-TECS-0010) in the framework of the “Investissements d’avenir” program (ANR-15-IDEX-02). Michael Furian is supported by the Swiss National Science Foundation Fellowship “Postdoc.Mobility” (191029). Michael Furian, Konrad E. Bloch, and Silvia Ulrich are supported by the Swiss National Science Foundation project grant (192048). Devices and consumables used for this study were kindly provided by MediPines Corporation (Newport Beach, CA, USA). However, the sponsor had no further involvement in any steps of the study (study design, collection, and analysis of the data or writing of the manuscript).

**Institutional Review Board Statement:** The study was approved by the Ethics Committee of the National Center for Cardiology and Internal Medicine (01-2021, Bishkek, Kyrgyzstan) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

**Informed Consent Statement:** Written informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data are available upon reasonable request to the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** Pr. Silvia Ulrich receives grants from the Swiss National Science Foundation, Zurich Lung, Swiss Lung League, and EMDO Foundation and grants, speaker and advisory fees, and travel support from Orpha Swiss, MSD SA, Janssen, and Novartis not related to the present work.

## References

1. Wagner, P.D. The physiological basis of pulmonary gas exchange: Implications for clinical interpretation of arterial blood gases. *Eur. Respir. J.* **2015**, *45*, 227–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Riley, R.L.; Cournand, A. ‘Ideal’ Alveolar Air and the Analysis of Ventilation-Perfusion Relationships in the Lungs. *J. Appl. Physiol.* **1949**, *1*, 825–847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Petersson, J.; Glenny, R.W. Gas exchange and ventilation-perfusion relationships in the lung. *Eur. Respir. J.* **2014**, *44*, 1023–1041. [[CrossRef](#)]
4. Uemasu, K.; Sato, S.; Muro, S.; Sato, A.; Tanabe, N.; Hasegawa, K.; Hamakawa, Y.; Mizutani, T.; Fuseya, Y.; Tanimura, K.; et al. Annual decline in arterial blood oxygen predicts development of chronic respiratory failure in COPD with mild hypoxaemia: A 6-year follow-up study. *Respirology* **2019**, *24*, 262–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Agusti, A.; Faner, R. Lung function trajectories in health and disease. *Lancet Respir. Med.* **2019**, *7*, 358–364. [[CrossRef](#)]
6. Hardinge, M.; Annandale, J.; Bourne, S.; Cooper, B.; Evans, A.; Freeman, D.; Green, A.; Hippolyte, S.; Knowles, V.; MacNee, W.; et al. British Thoracic Society guidelines for home oxygen use in adults. *Thorax* **2015**, *70* (Suppl. S1), i1–i43. [[CrossRef](#)]

7. Giner, J.; Casan, P.; Belda, J.; González, M.; Miralda, R.M.; Sanchis, J. Pain During Arterial Puncture. *Chest* **1996**, *110*, 1443–1445. [CrossRef]
8. Pickerodt, P.A.; Kuebler, W.M. Go West: Translational physiology for noninvasive measurement of pulmonary gas exchange in patients with hypoxemic lung disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2019**, *316*, L701–L702. [CrossRef]
9. West, J.B.; Prisk, G.K. A new method for noninvasive measurement of pulmonary gas exchange using expired gas. *Resp. Physiol. Neurobiol.* **2018**, *247*, 112–115. [CrossRef]
10. Prisk, G.K.; West, J.B. Deriving the arterial Po<sub>2</sub> and oxygen deficit from expired gas and pulse oximetry. *J. Appl. Physiol.* **2019**, *127*, 1067–1074. [CrossRef]
11. Prisk, G.K.; West, J.B. Non-invasive Measurement of Pulmonary Gas Exchange Efficiency: The Oxygen Deficit. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 757857. [CrossRef]
12. West, J.B.; Wang, D.L.; Prisk, G.K.; Fine, J.M.; Bellinghausen, A.; Light, M.; Crouch, D.R. Noninvasive measurement of pulmonary gas exchange: Comparison with data from arterial blood gases. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2019**, *316*, L114–L118. [CrossRef]
13. Howe, C.A.; MacLeod, D.B.; Wainman, L.; Oliver, S.J.; Ainslie, P.N. Validation of a Noninvasive Assessment of Pulmonary Gas Exchange During Exercise in Hypoxia. *Chest* **2020**, *158*, 1644–1650. [CrossRef]
14. West, J.B.; Crouch, D.R.; Fine, J.M.; Makadia, D.; Wang, D.L.; Prisk, G.K. A New, Noninvasive Method of Measuring Impaired Pulmonary Gas Exchange in Lung Disease: An Outpatient Study. *Chest* **2018**, *154*, 363–369. [CrossRef]
15. West, J.B.; Wang, D.L.; Prisk, G.K. Measurements of pulmonary gas exchange efficiency using expired gas and oximetry: Results in normal subjects. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2018**, *314*, L686–L689. [CrossRef]
16. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease(2022 Report). Available online: [https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2021/12/GOLD-REPORT-2022-v1.1-22Nov2021\\_WMV.pdf](https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2021/12/GOLD-REPORT-2022-v1.1-22Nov2021_WMV.pdf) (accessed on 16 January 2023).
17. Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-copd> (accessed on 16 January 2023).
18. Kent, B.D.; Mitchell, P.D.; McNicholas, W.T. Hypoxemia in patients with COPD: Cause, effects, and disease progression. *Int. J. Chronic. Obs. Pulmon. Dis.* **2011**, *6*, 199–208.
19. Furian, M.; Mademilov, M.; Buergin, A.; Scheiwiller, P.M.; Mayer, L.; Schneider, S.; Emilov, B.; Lichtblau, M.; Bitos, K.; Muralt, L.; et al. Acetazolamide to Prevent Adverse Altitude Effects in COPD and Healthy Adults. *Nejm. Évid.* **2022**, *1*. [CrossRef]
20. Nawrocki, J.; Furian, M.; Buergin, A.; Mayer, L.; Schneider, S.R.; Mademilov, M.; Bloch, M.; Sooronbaev, T.M.; Ulrich, S.; Bloch, K.E. Validation of a Portable Blood Gas Analyzer for Use in Challenging Field Conditions at High Altitude. *Front. Physiol.* **2021**, *11*, 600551. [CrossRef]
21. Graham, B.L.; Steenbruggen, I.; Miller, M.R.; Barjaktarevic, I.Z.; Cooper, B.G.; Hall, G.L.; Hallstrand, T.S.; Kaminsky, D.A.; McCarthy, K.; McCormack, M.C.; et al. Standardization of Spirometry 2019 Update. An Official American Thoracic Society and European Respiratory Society Technical Statement. *Am. J. Resp. Crit. Care* **2019**, *200*, e70–e88. [CrossRef]
22. Bland, J.M.; Altman, D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* **1986**, *327*, 307–310. [CrossRef]
23. Montenij, L.J.; Buhre, W.F.; Jansen, J.R.; Kruitwagen, C.L.; EE de, W. Methodology of method comparison studies evaluating the validity of cardiac output monitors: A stepwise approach and checklist. *Bja. Br. J. Anaesth.* **2016**, *116*, 750–758. [CrossRef] [PubMed]
24. Giavarina, D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem. Med.* **2015**, *25*, 141–151. [CrossRef] [PubMed]
25. Mcguire, W.C.; Crouch, D.R.; Pearce, A.; West, J.B.; Prisk, G.K.; Elliott, A.R.; Fine, J.M.; Malhotra, A. The Use of the Alveolar Gas Meter for Assessment of Gas Exchange Abnormalities in COVID-19. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **2021**, *203*, A4454.
26. Amaza, I.; Kalra, H.; Eberlein, M.; Jethava, Y.; McDonell, J.; Wolfe, B.; Tomasson, M.H.; Bates, M.L. Case Studies in Physiology: Untangling the cause of hypoxemia in a patient with obesity with acute leukemia. *J. Appl. Physiol.* **2021**, *131*, 788–793. [CrossRef] [PubMed]
27. West, J.B.; Liu, M.A.; Stark, P.C.; Prisk, G.K. Measuring the efficiency of pulmonary gas exchange using expired gas instead of arterial blood: Comparing the “ideal” Po<sub>2</sub> of Riley with end-tidal Po<sub>2</sub>. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2020**, *319*, L289–L293. [CrossRef]
28. Cao, M.; Stringer, W.W.; Corey, S.; Orogian, A.; Cao, R.; Calmelat, R.; Lin, F.; Casaburi, R.; Rossiter, H.B.; Porszasz, J. Transcutaneous PCO<sub>2</sub> for Exercise Gas Exchange Efficiency in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Copd. J. Chronic. Obs. Pulm. Dis.* **2020**, *18*, 16–25. [CrossRef]
29. Furian, M.; Hartmann, S.E.; Latshang, T.D.; Flueck, D.; Murer, C.; Scheiwiller, P.M.; Osmonov, B.; Ulrich, S.; Kohler, M.; Poulin, M.J.; et al. Exercise Performance of Lowlanders with COPD at 2590 m: Data from a Randomized Trial. *Respiration* **2018**, *95*, 422–432. [CrossRef]
30. Neder, J.A.; Kirby, M.; Santyr, G.; Pourafkari, M.; Smyth, R.; Phillips, D.B.; Crinion, S.; de-Torres, J.P.; O’Donnell, D.E. Ventilation/Perfusion Mismatch: A Novel Target for COPD Treatment. *Chest* **2022**, *162*, 1030–1047. [CrossRef]
31. Liu, M.A.; Stark, P.C.; Prisk, G.K.; West, J.B. Oxygen deficit is a sensitive measure of mild gas exchange impairment at inspired O<sub>2</sub> between 12.5% and 21%. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2020**, *319*, L91–L94. [CrossRef]

32. Kuenzel, A.; Marshall, B.; Verges, S.; Anholm, J.D. Positional Changes in Arterial Oxygen Saturation and End-Tidal Carbon Dioxide at High Altitude: Medex 2015. *High. Alt. Med. Biol.* **2020**, *21*, 144–151. [[CrossRef](#)]
33. Jamali, H.; Castillo, T.L.; Morgan, C.C.; Coult, J.; Muhammad, J.L.; Osobamiro, O.O.; Parsons, E.C.; Adamson, R. Racial Disparity in Oxygen Saturation Measurements by Pulse Oximetry: Evidence and Implications. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **2022**, *19*, 1951–1964. [[CrossRef](#)]
34. Lichtblau, M.; Latshang, T.D.; Furian, M.; Müller-Mottet, S.; Küest, S.; Tanner, F.; Grünig, E.; Bloch, K.E.; Ulrich, S. Right and Left Heart Function in Lowlanders with COPD at Altitude: Data from a Randomized Study. *Respiration* **2019**, *97*, 125–134. [[CrossRef](#)]
35. Furian, M.; Flueck, D.; Latshang, T.D.; Scheiwiller, P.M.; Segitz, S.D.; Mueller-Mottet, S.; Murer, C.; Steiner, A.; Uirich, S.; Rothe, T.; et al. Exercise performance and symptoms in lowlanders with COPD ascending to moderate altitude: Randomized trial. *Int. J. Chron. Obs. Pulmon. Dis.* **2018**, *13*, 3529–3538. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.