



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle et mécanistique des ulcères de jambe des patients drépanocytaires

Judith Catella-Chatron

► **To cite this version:**

Judith Catella-Chatron. Caractérisation fonctionnelle et mécanistique des ulcères de jambe des patients drépanocytaires. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2024. Français. NNT : 2024LYO10207 . tel-04807233

HAL Id: tel-04807233

<https://theses.hal.science/tel-04807233v1>

Submitted on 27 Nov 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.



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale ED 205

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

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

Discipline : Physiologie, Biologie Vasculaire et du Globule Rouge

Soutenue publiquement le 05/11/2024, par :

Judith CATELLA

Caractérisation fonctionnelle et mécanistique des ulcères de jambe des patients drépanocytaires

Devant le jury composé de :

Présidente :

Carine Halfon Domenech, PUPH, Université Claude Bernard Lyon 1, CIRI

Rapporteurs :

Bartolucci Pablo, PU-PH, Université Paris-Est Créteil, APHP IMRB, U955

Blaise Sophie, PU-PH, Université Grenoble Alpes,

Walther Guillaume, MCU, Université d'Avignon, LaPEC

Invitée :

Long Anne, PU-PH, Université Claude Bernard Lyon 1, LIBM

Directeurs de thèse :

Fromy Bérengère, DR CNRS, LBTI

Guillot Nicolas, MCU, INSA, Lyon



Résumé

Résumé en français

La drépanocytose est la maladie génétique la plus fréquente en France et dans le monde (500 naissances par an en France). Cette hémoglobinopathie est responsable de la production de l'hémoglobine S mutée (HbS) qui a la propriété de polymériser en condition desoxygénée, entraînant la falciformation des globules rouges (GRs). Les GRs des patients souffrant d'une drépanocytose SS sont moins déformables et plus fragiles que les GRs des sujets sains. La drépanocytose SS est caractérisée par la présence d'une anémie hémolytique chronique, des crises vaso occlusives douloureuses répétées ainsi que de multiples autres complications aiguës et chroniques dont les ulcères de jambe. La drépanocytose SS est autant une maladie du GR que des vaisseaux. L'hémolyse et l'inflammation chroniques, les anomalies de la coagulation et la diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (nitric oxide (NO) en anglais) sont à l'origine d'une dysfonction vasculaire importante. Toutefois, la survenue des ulcères de jambe est imprévisible et mal comprise. Nous avons fait l'hypothèse qu'il existait une atteinte microvasculaire plus prononcée chez les patients souffrants d'ulcère de jambe.

L'étude drépanO2 a inclus 65 patients atteints de drépanocytose sans infection ou crise vaso occlusive dans les 3 derniers mois. L'objectif était d'étudier simultanément la fonction microcirculatoire de la peau (en mesurant la pression transcutanée en oxygène et la vasodilatation en réponse à la chaleur, au courant et à l'acétylcholine) et différents paramètres biologiques sanguins en fonction de la présence ou non d'ulcères de jambe. Nous avons également testé l'effet du plasma de patients avec et sans ulcères de jambe sur l'activation de cellules endothéliales.

Parmi les 65 patients inclus, un ulcère de jambe actif a été diagnostiqué chez 9 patients (LU+). Tous les patients inclus avaient un traitement modifiant la maladie à l'exception d'un seul. Chez les 9 patients avec ulcère actif, nous avons observé une altération de la fonction microvasculaire de la peau, sans modification pour les marqueurs d'inflammation plasmatique ni l'activation des cellules endothéliales. Parmi ces 9 patients avec ulcères actifs, 8 ont pu ensuite être suivis sur une période de 8 mois, dont 6 ont cicatrisé en environ 4 mois. Nos résultats ont montré que la fonction microcirculatoire cutanée s'est améliorée après cicatrisation.

Nos résultats montrent donc une atteinte fonctionnelle de la microcirculation cutanée moins prononcée après cicatrisation. L'exploration de l'inflammation, coagulation, hémolyse et rhéologie sanguine n'a pas mis en évidence de différences entre les patients avec ou sans ulcères de jambes.

D'autres études sont nécessaires pour progresser sur les mécanismes sous-jacents de cette complication.

Résumé en anglais

Sickle cell disease is the first genetic disorder in France and worldwide (around one birth over 2,000 in USA). This hemoglobinopathy leads to the production of a mutated hemoglobin called hemoglobin S (HbS) which has the property to polymerize in deoxygenated condition, leading to red blood cell (RBC) sickling. Sickle cell anemia (SCA) patient RBCs are more fragile and less deformable than RBC from healthy individuals. Patients suffer from hemolytic anemia, repeated painful vaso-occlusive crisis and other acute and chronic complications including leg ulcers (LU). SCA is both a RBC disease and a vascular disease. Chronic hemolysis and inflammation, coagulation abnormalities and decrease nitric oxide bioavailability are the causes of significant vascular dysfunction. However, LU are an unpredictable debilitating complication of sickle cell anemia (SCA). We hypothesized that SCA patients with LU would be characterized by lower microvascular reactivity than patients without LU.

The DrepanO2 study included 65 adults with SCA in steady-state condition. The aim was to investigate simultaneously the skin microcirculatory function (measuring transcutaneous oxygen pressure and heat, current and acetylcholine-related vasodilatation) and several blood biological parameters in SCA patients with and without LU. We also tested the effects of plasma from patients with and without LU on endothelial cells activation (HDMEC in 2D culture).

Over the 65 patients included, LU has been diagnosed in 9 patients (LU+). All patients had disease-modifying treatment except one. We observed a reduction of the skin microcirculatory function in the 9 LU+ patients, with no change in plasma inflammation markers or endothelial cell activation.

Among the 9 patients with active ulcers (LU+ group), 8 were subsequently followed over a period of 8 months, 6 of whom healed in approximately 4 months. Our results showed that skin microcirculatory function improved after healing.

Our results therefore showed less pronounced functional impairment of cutaneous microcirculation after healing. Investigation of inflammation, coagulation, hemolysis, and blood rheology did not reveal any differences between patients with or without leg ulcers. Further studies are needed to better understand the underlying mechanisms of this complication.

« Tu n'échoues qu'au moment où tu arrêtes d'essayer »

Albert Einstein

Encore une étape clé qui s'apprête à être franchie, et qui n'aurait pas pu l'être si je n'avais pas essayé.

« L'art médical consiste à distraire le malade pendant que la nature le guérit »

Voltaire

C'est parfois mon sentiment pour la médecine, notamment pour le traitement des ulcères de jambe des patients drépanocytaires dont le traitement consiste principalement à limiter l'œdème avec la compression veineuse et en surélevant les membres inférieurs.

Remerciements

A mes maitres, vous m'avez accompagné vers un pan de la recherche que je ne connaissais pas. Merci pour votre patience et votre bienveillance tout au long de ce travail.

A Philippe, merci de m'avoir ouvert les portes de ta famille du labo. Nous avons tous de la chance de t'avoir.

A tous les patients qui me donnent chaque jour envie de continuer,

A tous les patients drépanocytaires ayant participé : vous avez offert votre temps, votre sang et plus précieux encore, votre confiance en venant participer à cette étude. J'espère que ce travail s'inscrira dans la continuité pour avancer dans la compréhension et la prise en charge des ulcères de jambe de la drépanocytose.

A l'équipe drépano, ce travail n'aurait pas été possible sans le formidable centre de référence que vous avez su construire et développer. Merci pour votre soutien et bravo pour votre travail.

Aux équipes des labo LBTI, LIBM et hémostase et thrombose, sans vous les données seraient restées à l'état de tubes de sang, merci de m'avoir ouvert la porte d'un autre monde. Vous m'avez appris à faire opérer la magie.

A Azeddine, tu m'as aidé à franchir la haie qui me séparait des plaies et me voilà maintenant passionnée par le sujet. Merci pour tes conseils précieux et ta franchise. Sauras t-on franchir ensemble la haie du traitement des varices ?

A toute l'équipe de l'unité de médecine vasculaire, vous m'avez tous aidés pour rendre cette étude possible et je vous en suis très reconnaissante. On a encore pleins de projets à mener dans l'avenir et j'espère que vous serez à mes côtés.

A ma famille, merci de croire en moi et de me soutenir. Je vous aime.

Les publications/communications réalisées dans le cadre de ma thèse sont soulignées.

Publications internationales (18 dont 8 en 1^{er} auteur)

Articles

1. **Catella J**, Turpin E, Connes P, Nader E, Carin R, Martin M, Rezigue H, Nougier C, Dargaud Y, Josset-Lamaugarny A, Dugrain J, Marano M, Leuci A, Boisson C, Renoux C, Joly P, Poutrel S, Hot A, Guillot N, Fromy B. Impaired microvascular function in patients with sickle cell anemia and leg ulcers improved with healing. *Br J Haematol* 2024 Sept
2. **Catella J**, Rivoire E, Abejiou I, Quiquandon S, Desmurs-Clavel S, Dargaud Y. Age is a risk factor for poor knowledge about venous thromboembolism treatment. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2024 Sept
3. David J, Desmurs-Clavel H, Mechtouff L, Long A, Dargaud Y, **Catella J**. The obstetrical consequences of ischemic stroke in women of childbearing age. *Arch Gynecol Obstet*. 2024 Apr 29
4. Cohen O, Kenet G, Levy-Mendelovich S, Tzoran I, Brenner B, De Ancos C, López-Miguel P, Varona JF, **Catella J**, Monreal M; and the RIETE investigators. Outcomes of venous thromboembolism in patients with inherited thrombophilia treated with direct oral anticoagulants: insights from the RIETE registry. *J Thromb Thrombolysis*. 2024 Apr
5. **Catella J**, Schiava ND, L'Hoia F, Lermusiaux P, Millon A, Long A., An angiosome-centred approach for TcpO2 electrode positioning ,*Vasa*. 2023 May
6. Poutrel S, Boisson C, Nader E, Renoux C, Viot E, **Catella J**, Marie M, Hot A, Cannas G, Bertrand Y, Joly P, Connes C, Merazga S, Gauthier A, Connes P. Clinical severity and blood rheology in patients with sickle cell anaemia and co-existing autoimmune disease. *Br J Haematol*, 2023 Feb
7. Dubois-Silva A, Barbagelata-López C, Piñeiro-Parga P, López-Jiménez L, Riera-Mestre A, Schellong S, **Catella J**, Bosevski M, Roca Toledo M, Monreal M and the RIETE Investigators, Deep vein thrombosis symptoms and 30-day mortality in acute pulmonary embolism, *Eur J of Intern Med* 2022
8. **Catella J**, Bertoletti L, Moustafa F, Nieto JA, Valle E, Pedrajas JM, Villalobos A, Quere I, Sartlon-Bartoli G, Monreal M ; RIETE Investigators. Major Gastrointestinal Bleeding in patients receiving anticoagulant therapy for venous thromboembolism. *Thromb Res*. 2022 Jun
9. **J. Catella**, N Della-Schiava, L Calanca, E Steinmetz, A Million, A Long, L Mazzolai. Real practice of TcPO2 measurements: a French national survey. *Vasc Med* 2022 May
10. Nader E, Nougier C, Boisson C, Poutrel S, **Catella J**, Martin F, Charvet J, Girard S, Havard-Guibert S, Martin M, Rezigue H, Desmurs Clavel H, Renoux C, Joly P, Guillot N, Bertrand Y, Hot A, Dargaud Y, Connes P. Increased blood viscosity and red blood cell aggregation in patients with COVID-19. *Am J Hematol* 2022 Mar
11. Giraud M, **Catella J**, Cognet L, Helfer H, Acassat S, Chapelle C, Mismetti P, Laporte S, Mahé I, Bertoletti. Management of acute venous thrombo embolism in patients taking antiplatelet therapy. *Thromb Res* 2021 Dec
12. Fernandez-Capitan C, Barba R, Diaz-Pedroche M, Siguenza P, Demelo-Rodriguez P, Siniscalchi C, Pedrajas JM, Farfan-Sedano AI, Olivera PE, Gomez-Cuervo C, Llamas P, Villares P, Sanchez O, Lopez-Reyes R, **Catella J**, Bikdeli B, Weinberg I, Tafur AJ, Jimenez D, Monreal M. Presenting Characteristics, Treatment Patterns and Outcomes among Patients with Venous Thromboembolism During Hospitalization for COVID-19. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2021

13. Chauvelot L, Gamondes D, Berthiller J, Nieves A, Renard S, **Catella-Chatron J**, Ahmad K, Bertoletti L, Camara B, Gomez E, Launay D, Montani D, Mornex JF, Prévot G, Sanchez O, Schott AM, Subtil F, Traclet J, Turquier S, Zeghmar S, Habib G, Reynaud-Gaubert M, Humbert M, Cottin V. Hemodynamic response to treatment and outcome in pulmonary hypertension associated with interstitial lung disease versus pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2020
14. **Catella J**, Costes F, Gaultier JB, Court-Fortune I, Tunale C, De Magalhaes E, Accassat S, Chomette-Ballereau S, Chapelle C, Bertoletti L. DLNO/DLCO ratio evolution under targeted therapy in patients with pulmonary hypertension. *RESPNB* 2020
15. Mery B, Fouilloux, Rowinsky E, **Catella-Chatron J**, Guichard JB, Da Costa A, Tinquaut F, Magné N, Bertoletti L. Cardiovascular disease events within 5 years after a diagnosis of breast cancer. *BMC Cancer* 2020 Apr 21.
16. **Catella J**, Bertoletti L, Mismetti P, Ollier E, Samperiz A, Soler S, Surinach JM, Mahé I, Lorente MA, Braester A, Monreal M. Severe renal impairment and risk of bleeding during anticoagulation for venous thromboembolism. *JTH* 2020 Apr 16
17. Bonnefoy PB, Margelidon-Cozzolino V, **Catella-Chatron J**, Ayoub E, Guichard JB, Murgier M, Bertoletti L. What's next after the clot? Residual pulmonary vascular obstruction after pulmonary embolism: From imaging finding to clinical consequences. *Thromb Res* 2019 Dec
18. **Catella-Chatron J**, Merah A, De Magalhaes E, Moulin N, Accassat S, Duvillard C, Mismetti P, Bertoletti L. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension suspicion after pulmonary embolism in cancer patients. *Respir Med Res* 2019 Nov

Lettre à l'éditeur

1. **Catella J**, Joly M, Pernod G. Is pulmonary embolism occurring after SARS COV-2 vaccination provoked or unprovoked ? *Thromb Res* 2022 May

Revues

1. **Catella J**, Guillot N, Nader E, Skinner S, Poutrel S, Hot A, Connes P, Fromy B. Controversies in the pathophysiology of leg ulcers in sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2024 Jul
2. **Catella J**, Mahé G, Leftheriotis G, Long A., Reference Probe for TcPO₂ at Rest: A Systematic Review. *Diagnostics (Basel).* 2022 Dec
3. **Catella J**, Long A, Mazzolai L. What is currently the role of TcPO₂ in the choice of the amputation level of lower limbs ? a comprehensive review. *J Clin Med* 2021
4. Margelidon-Cozzolino V, Delavenne X, **Catella-Chatron J**, De Magalhaes E, Bezzeghoud S, Humbert M, Montani D, Bertoletti L. Indications and potential pitfalls of anticoagulants in pulmonary hypertension: Would DOACs become a better option than VKAs? *Blood Rev.* 2019 May 15

Publications en français

1. **J. Catella-Chatron**, JC Lega, P Mismetti, L Bertoletti. Le parcours de soins d'un patient atteint d'embolie pulmonaire, Juin 2020
2. **J. Catella-Chatron**, L. Bertoletti, O. Sanchez, P. Mismetti. Traitement ambulatoire de l'Embolie Pulmonaire, La lettre du Pneumologue, April 2018
3. **J. Catella-Chatron**, C. Le Hello, L. Bertoletti, S. Grange, FG Barral, C. Boissier, P. Mismetti. Interruption partielle de la veine cave inférieure, Encyclopédie Médico-Chirurgicale

4. **J. Catella-Chatron**, L. Bertoletti , C. Le Hello , A. Seferian, A. Boucly , B. Girerd, D. Montani. Complications pulmonaires de la neurofibromatose, Encyclopédie Médico-Chirurgicale
5. Reynaud Q, **J Catella**, Diconne E, Lafond P, Tardy B. No surgery without previous compression ultrasound in patients with a superficial venous thrombosis: a case of massive paradoxical embolism. Ann Fr Anesth Reanim. 2014 January

Communications orales (11 dont 4 internationales)

1. **Catella J**, Connes P, Nader E, Carin R, Martin M, Rezigue H, Nougier C, Josset Lamaugarny A, Boisson C, Renoux C, Joly P, Poutrel S, Hot H, Guillot N, Fromy B. Fonctional and mechanistic characterization of leg ulcers in patients with sickle cell disease. Journée de l'EDISS, novembre 2023.
2. **Catella J**, Connes P, Nader E, Carin R, Martin M, Josset Lamaugarny A, Boisson C, Renoux C, Joly P, Poutrel S, Hot H, Guillot N, Fromy B. Etude DrépanO2. Assemblée Générale du LIBM, juin 2023
3. **Catella J**, Bertoletti L, Moustafa F, Nieto JA, Valle E, Pedrajas JM, Villalobos A, Quere I, Sartlon-Bartoli G, Monreal M ; RIETE Investigators. Hémorragies gastro-intestinales majeures chez les patients anticoagulants pour une maladie thrombo-embolique veineuse. SFMV sept 22
4. **Catella J**, Bertoletti L, Moustafa F, Nieto JA, Valle E, Pedrajas JM, Villalobos A, Quere I, Sartlon-Bartoli G, Monreal M ; RIETE Investigators. Major Gastrointestinal Bleeding in patients receiving anticoagulant therapy for venous thromboembolism. ISTH, Londres, Juillet 2022
5. **J. Catella**, N Della-Schiava, L Calanca, E Steinmetz, A Million, A Long, L Mazzolai. Résultat de l'enquete de pratique sur la mesure de la TcPO2, CFPV Paris, Mars 2022
6. J David, **J Catella**, L Mechtouff, Y zerbib, A Long, Y Dargaud, H Desmurs Clavel. Infartus cérébral chez les femmes en âge de procréer: conséquences sur leur avenir obstétrical. CFPV, Paris, Mars 2022
7. **J Catella**, L Bertoletti, F Moustafa, JA Nieto, Reina Valle, JM Pedrajas, Aurora Villalobos, I Quere, G Sarlon-Bartoli, M Monreal, and the RIETE Investigators. Major gastrointestinal bleeding in patients receiving anticoagulant therapy for venous thromboembolism: a score to identify high risk patients. Eurospring VTE School, Crête, Septembre 2021
8. **J Catella**, N Della Schiava, F L'Hoia, P Lermusiaux, A Millon, A Long. Placer la TcPO2 en fonction des angiosomes : bonne idée ? SFMV, Cannes, Septembre 2021
9. **J Catella-Chatron**, L Bertoletti, P Mismetti, E Ollier, A Samperiz, S Soler, JM Suriñach, MA Lorente, A Braester, M Monreal. Seeking severe renal failure in patients anticoagulated for an acute venous thromboembolism: does the formula count? Prix du jeune chercheur ECTH, Marseille, October 2018
10. **J Catella-Chatron**, A Merah, E De Magalhaes, N Moulin, S Acassat, C Duvillard, P Mismetti, L Bertoletti. Frequency of chronic thromboembolic pulmonary hypertension screening after pulmonary embolism in cancer patients, European Respiratory Society, Paris, September 2018
11. **J Catella-Chatron**, L. Bertoletti, P. Mismetti, M. Monreal, A. Samperiz, S.Soler, I.Mahé. Evaluation de la fonction rénale et risque hémorragique : rôle de la formule utilisée ? Collège Français de pathologie Vasculaire, Paris, March 2018

Communications invitées (2 dont 1 internationale):

1. **Catella J**, Connes P, Nader E, Carin R, Martin M, Josset Lamaugarny A, Boisson C, Renoux C, Joly P, Poutrel S, Hot H, Guillot N, Fromy B. Drépanocytose et Microcirculation. Workshop Microcirculation., juin 2023
2. **J Catella-Chatron**, L Bertoletti, P Mismetti, E Ollier, A Samperiz, S Soler, JM Suriñach, MA Lorente, A Braester, M Monreal. Renal function assessment and bleeding prediction in patients receiving anticoagulant therapy for venous thrombo embolism, XIV Forum Multidisciplinar de la Enfermedad Tromboembolica Venosa, Madrid, May 2019

Communications affichées (10 dont 3 internationales):

1. Hafdi L, ..., **Catella J**. Retour sur un programme de dépistage de l'artériopathie des membres inférieurs aux Hospices Civils de Lyon. SFMV, Saint Malo, Septembre 2023.
2. Nader E, Nougier C, Boisson C, Poutrel S, **Catella J**, Martin F, Charvet J, Girard S, Havard-Guibert S, Martin M, Rezigue H, Desmurs Clavel H, Renoux C, Joly P, Guillot N, Bertrand Y, Hot A, Dargaud Y, Connes P. Increased blood viscosity and red blood cell aggregation in patients with COVID-19. ISTH, Londres, Juillet 2022,
3. M. Giraud, **J Catella**, L Cognet, H Helfer, S Acassat, C Chapelle, P Mismetti, S Laporte, I Mahé, L Bertoletti. Prise en charge des patients, sous anti agregation plaquettaires, présentant une maladie thromboembolique veineuse. CFPV, Paris, Octobre 2021
4. P. Mourzelas, **J. Catella**, C Fourni, A. Long, H Desmurs Clavel. Thrombose tardive de la veine du greffon: prise en charge et pronostic. CFPV, Paris, Octobre 2021
5. **J Catella-Chatron**, A Stefanescu, R Chamberod, L Mazzolai. De l'embryologie à la vraie vie : à propos d'un cas de duplication filtrée, Société Française de Médecine Vasculaire, Strasbourg, Septembre 2019
6. **J Catella-Chatron**, L Bertoletti, P Mismetti, E Ollier, A Samperiz, S Soler, JM Suriñach, MA Lorente, A Braester, M Monreal. Renal function assessment and bleeding prediction in patients receiving anticoagulant therapy for venous thrombo embolism, Societe Francaise de Pharmacologie et Thérapeutique, Juin 2019
7. L Chauvelot, D Gamondes, J Berthiller, S Renard, **J Catella-Chatron**, K Ahmad, L Bertoletti, B Camara, E Gomez, D Launay, D Montani, JF Mornex, S Polazzi, G Prevot, O Sanchez, AM Schott-Pethelaz, J Traclet... V Cottin. Pneumopathie interstitielle et hypertension pulmonaire au cours de la sclérodémie systémique dans l'étude HYPID, 23e Congrès de Pneumologie de Langue Française, Janvier 2019
8. **J Catella-Chatron**, A Merah, E De Magalhaes, N Moulin, S Acassat, C Duvillard, P Mismetti, L Bertoletti. Frequence de la suspicion d'hypertension pulmonaire chez les patients cancéreux avec embolie pulmonaire, SFMV, La Rochelle, Septembre 2018
9. **J Catella-Chatron**, A Merah, E De Magalhaes, N Moulin, S Acassat, C Duvillard, P Mismetti, L Bertoletti. Frequency of chronic thromboembolic pulmonary hypertension screening after pulmonary embolism in cancer patients, ICTHIC, Bergamo, Avril 2018
10. **J Catella-Chatron**, E De Magalhaes, S Chomette-Ballereau, J Gaultier, I Court-Fortune, C Chapelle, F Costes, C Tulane, A Gate-Martinet, L Bertoletti. Evolution of DLNO/DLCO ratio after initiation of targeted PH therapy in naïve patients, European Respiratory Society, Milan, Septembre 2017

Table des matières

Liste des figures	17
Abréviations	20
Introduction	24
Partie 1. Revue de la littérature	26
Chapitre 1 – Hémorhéologie et globule rouge	27
I. Hémorhéologie	27
II. Globule rouge	29
1. Agrégation érythrocytaire	30
2. Déformabilité érythrocytaire	31
III. Hémoglobine	32
IV. Hémoglobinopathies	35
1. Thalassémies	35
2. Anomalies qualitatives de l'hémoglobine	35
2.1 Drépanocytose SS	35
2.2 Drépanocytose SC	36
2.3 β -thalasso-drépanocytose	37
2.4 Syndromes drépanocytaires majeurs composites	37
Chapitre 2– La drépanocytose SS	38
I. Historique	38
II. Epidémiologie	38
III. Diagnostic	39
1. Diagnostic enfant/adulte	39
2. Diagnostic avant la conception	40
3. Diagnostic prénatal	40
4. Diagnostic néonatal	40
IV. Physiopathologie de la drépanocytose	41
1. Polymérisation de l'HbS	41
2. Anomalies vasculaires	42
2.1 Altération de la membrane des GRs	42
2.2 Hémyolyse	42
2.3 Stress oxydant	44
2.4 Activation de l'endothélium (Figure 19)	46

2.5	Activation de la coagulation	48
2.6	Inflammation et immunité	50
2.7	Tonus vasculaire	50
2.8	Biodisponibilité du NO.....	51
2.9	Profil hémorhéologique à l'état de base	52
V.	Complications cliniques.....	53
1.	Différents phénotypes.....	53
1.1	Phénotype hémolytique	54
1.2	Phénotype visqueux vaso occlusif.....	54
2.	Complications du phénotype hémolytique (figure 23)	55
2.1	Ulcères de jambe	55
2.2	Anémie.....	55
2.3	Hypertension pulmonaire.....	55
2.4	Autres complications pulmonaires chroniques	56
2.5	Priapisme	56
2.6	Vasculopathies cérébrales.....	57
2.7	Complications cardiaques.....	57
2.8	Complications rénales	58
3.	Complications du phénotype vaso-occlusif.....	59
3.1	Crises vaso occlusives (CVO).....	59
3.2	Syndrome thoracique aigu	60
3.3	Ostéonécrose.....	60
4.	Autres complications	61
4.1	Splénomégalie et asplénie.....	61
4.2	Complications hépatiques	61
4.3	Complications biliaires.....	61
4.4	Complications oculaires.....	61
VI.	Modulateurs génétiques	62
1.	Hémoglobine fœtale.....	62
2.	Alpha-thalassémie	62
3.	Déficit en G6PD.....	63
3.	Haplotype du gène βS	63
VII.	Thérapeutiques	63
1.	Traitements modifiant la maladie	64
1.1	Hydroxyurée	64
1.2	Voxelotor	65

1.3 Crizanlizumab	65
1.4 L-Glutamine	66
1.5 Activateur de pyruvate kinase.....	66
1.6 Monoxyde d'azote (NO)	67
2. Traitements de support.....	67
2.1 Prévention des infections	67
2.2 Antalgiques.....	67
2.3 Transfusion sanguine et érythrophérèse.....	67
2.4 Plasmaphérèse	68
3. Traitements curatifs	68
2.1 Greffe de moelle osseuse	68
2.2 Thérapie génique.....	68
4. La place des anti agrégants plaquettaires et anticoagulants	69
3.1 Anticoagulation	69
3.2 Anti agrégant plaquettaire	69
Chapitre 3 – Les ulcères de jambe du patient drépanocytaire	71
I. Phénomène ischémique initial	71
1. Caractéristiques générales des patients.....	71
2. Modifications vasculaires	72
3. Hémolyse	72
4. Susceptibilité génétique	73
II. Facteurs concourant au retard de cicatrisation	75
1. Insuffisance veineuse	75
2. Colonisation bactérienne	75
3. Altération de l'angiogenèse.....	76
III. Traitements	77
1. Traitements systémiques	77
1.1 Hydroxyurée	77
1.2 Transfusion	77
1.3 Oxygénothérapie hyperbare	78
1.4 Zinc (Figure 29)	78
2. Traitements d'avenir	79
2.1 Donneur de NO.....	79
2.2 Voxelotor	79
3. Traitements abandonnés systémiques.....	80
3.1 Arginine Butyrate	80

3.2 Inhibiteur du récepteur à l'endothéline	80
3.3 Isoxsuprine	80
3.4 Xanthinol Nicotinate.....	80
3.5 Erythropoïétine	80
3.6 Antibiotiques	81
3.7 La pentoxifylline	81
3.8 L-carnitine.....	81
3.9 Chélateurs du fer	81
3.10 Antithrombine III	82
3.11 Anticoagulation	82
4. Traitements locaux	82
4.1 Compression veineuse.....	82
4.2 Le choix du pansement.....	83
4.3 Matrice Extracellulaire Synthétique	83
4.4 Laser faible énergie	83
4.5 Oxygène transdermique en continu.....	84
4.6 Thérapie cellulaire autologue.....	85
4.7 Le miel	85
4.8 La greffe de peau.....	85
Chapitre 4 – La microcirculation cutanée.....	88
I. Anatomie	88
1. Anatomie de la peau	88
2. Anatomie de la microcirculation cutanée	90
II. La cellule endothéliale.....	92
1. Régulation de la perméabilité vasculaire	92
2. Anticoagulante et anti thrombotique	93
3. Adaptation à la contrainte de cisaillement	94
4. Participation à l'inflammation	95
5.Néoangiogenese.....	95
III. Le vaso-reflexe veino artériel	95
III. Régulation du flux sanguin cutané	96
1. Contrôle nerveux	96
2. Régulation endothélium dépendante	97
2.1 Monoxyde d'azote (Oxyde nitrique (NO) en anglais).....	97
2.2 Les Prostanoïdes.....	101
2.3 Endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHFs).....	103

3. Signal purinergique.....	103
Chapitre 5- La cicatrisation.....	104
I. Le processus de cicatrisation normal et l'hémostase.....	104
1. L'hémostase.....	104
2. La phase inflammatoire.....	107
2.1. Phase pro-inflammatoire : débridement de la plaie	107
2.2. Phase anti-inflammatoire : stimulation de la prolifération cellulaire	108
3. La phase proliférative	109
3.1 Fibroplasie	109
3.2 Réépithélialisation	109
3.3 Angiogenèse	109
3.4 Réinnervation	110
4. Phase de remodelage	111
5. Le rôle des neuromédiateurs dans la cicatrisation.....	111
5.1 Les neurotransmetteurs	111
5.2 Les neuropeptides	111
III. Des acteurs clé de la cicatrisation	112
1. Vascular Endothelial Growth Factor-A	112
2. Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α)	112
3. Les Interleukines.....	113
3.1 Interleukine 1	113
3.2 Interleukine 6 (IL-6)	113
3.3 Interleukine 8 (IL-8)	114
3.4 Interleukine 10	114
3.5 Interleukine 15	115
3.6 Les matrix métalloprotéases (MMPs)	115
4. La voie MAPK/ERK.....	116
II. Exemples d'anomalies de la cicatrisation.....	116
1. Ulcères veineux	116
2. Plaie du pied diabétique.....	118
Partie 2 : Travaux de recherche.....	120
Objectifs	121
I. Méthodologie	123
Patients.....	123
Prélèvement sanguin.....	125
1. Hématologie	125

1.1 Formule sanguine	125
1.2 Coagulation.....	125
2. Autres prélèvements biologiques.....	127
3. Marqueurs de l'inflammation :.....	127
4. Viscosité sanguine et ses déterminants rhéologiques	128
4.1 Viscosité sanguine	129
4.2 Déformabilité érythrocytaire.....	129
4.3 Agrégation érythrocytaire	131
Etude de la fonction vasculaire	132
1. Mesure des pressions artérielles.....	132
2. Mesure de la TcPO2.....	132
Etude de la dysfonction endothéliale.....	133
1. Etude de la vasodilatation	133
2. Evaluation de la fonction sensorielle cutanée.....	136
3. Prélèvement de l'exsudat (chez les patients LU+ uniquement).....	137
Culture cellulaire	137
1. Isolation de l'ARN total et qPCR	137
2. Western Blot.....	138
II. Résultats	139
Caractéristiques cliniques des patients inclus selon la présence d'un ulcère.....	142
Objectif 1 : Etude de la fonctionnalité microvasculaire	146
Objectif 2: Caractéristiques biologiques.....	146
1. Biologie Standard	146
2. Thromboélastographie (ROTEM)	149
3. Hémorhéologie.....	149
Objectif 3 : Analyse plasma et exsudat	151
1. Analyse du plasma selon le statut ulcère initial	151
2. Effet du plasma de patients sur des cellules endothéliales en culture	152
3. Analyse des exsudats selon l'évolution de l'ulcère	152
Objectif 4 : suivi des patients	154
1. Comparaison initiale des patients en fonction de la cicatrisation obtenue en 6 mois	154
2. Comparaison des patients cicatrisés entre les 2 visites	155
3. Comparaison des patients cicatrisés avec les patients sans ulcère	156
Discussion	158
Conclusion et Perspectives.....	166
Bibliographie.....	167

Liste des figures

- Figure 1 : Effet de la vitesse de cisaillement et des propriétés des GRs sur la viscosité sanguine
- Figure 2 : Evolution de la viscosité sanguine au cours du temps et à une vitesse de cisaillement fixe
- Figure 3 : Schéma de la structure d'un globule rouge
- Figure 4 : Les étapes de l'érythropoïèse
- Figure 5 : Globules rouges agrégés en rouleaux
- Figure 6 : Erythrocyte se déformant pour franchir un capillaire
- Figure 7 : Structure d'une molécule d'hémoglobine
- Figure 8 : Structure des différents gènes de globine
- Figure 9 : Facteurs influençant la dissociation de l'hémoglobine pour l'oxygène
- Figure 10 : Mode de transmission autosomique dominant
- Figure 11 : Frottis sanguin réalisé par le Dr Herrick chez un patient atteint d'anémie sévère et d'un syndrome pulmonaire grave
- Figure 12 : Carte du nombre estimé de naissance avec drépanocytose SS
- Figure 13 : Electrophorèse de l'hémoglobine par électrophorèse capillaire chez un patient drépanocytaire SS (réalisé au CBPE)
- Figure 14 : Fibre d'Hémoglobine S
- Figure 15 : Représentation des mécanismes menant à la déshydratation du GR drépanocytaire en condition désoxygénée
- Figure 16 : Mécanismes et conséquences de l'hémolyse
- Figure 17 : Différentes étapes de production des espèces réactives de l'oxygène
- Figure 18 : Activation endothéliale dans la vaso-occlusion
- Figure 19 : Adhésion des GRs dans la drépanocytose
- Figure 20 : Les vésicules extracellulaires
- Figure 21 : L'hémolyse intravasculaire réduit la biodisponibilité du NO
- Figure 22: Chevauchement des 2 phénotypes
- Figure 23 : Les complications cliniques de la drépanocytose
- Figure 24 : Scanner thoracique montrant une distribution homogène et diffuse de lésions kystiques associées à du verre dépoli diffus
- Figure 25 : Physiopathologie des pathologies cardiaques dans la drépanocytose

Figure 26 : Profil clinique et biologique typique au cours d'une crise vaso occlusive en l'absence d'infection ou autre complication

Figure 27 : Effet de l'hydroxyurée sur la rhéologie sanguine

Figure 28 : Le rôle de la pyruvate kinase dans la falciformation érythrocytaire

Figure 29 : Homéostasie du zinc en condition normale et déficit en zinc chez le patient drépanocytaire

Figure 30 : Mécanisme d'action du laser faible énergie

Figures 31 : Photo de plaies drépanocytaires avant et après greffe de peau

Figure 32 : Schéma des couches de la peau

Figure 33 : Anatomie la microcirculation cutanée

Figure 34 : Vaisseaux sanguins dans la microcirculation cutanée

Figure 35 : Représentation du rôle de la cellule endothéliale dans les voies de la coagulation et de la fibrinolyse

Figure 36 : Voies de vasodilatation endothélium dépendantes

Figure 37 : Structure de la eNOS et sites de régulation de son activité kinase dépendante

Figure 38 : Activation calcium-dépendante et - indépendante de la eNOS

Figure 39 : Découplage de la eNOS

Figure 40 : Les voies des prostanoïdes

Figure 41. Les sources cellulaires de nucléotides et nucléosides contrôlant la contractilité des vaisseaux sanguins

Figure 42 : Les 4 phases de la cicatrisation

Figure 43 : Concept actuel de la phase d'initiation de la coagulation

Figure 44 : Protéines régulatrices impliquées dans la séquence de l'interaction adhésive entre cellule endothéliale et leucocytes

Figure 45 : Phase précoce de la cicatrisation

Figure 46 : Les 3 phases de la néo-angiogenèse

Figure 47 : Cytokines élevées dans au moins 3 études sur les exsudats de plaie, biopsies cutanées et échantillons sanguins

Figure 48 : Mécanismes impliqués dans la plaie diabétique

Figure 49 : Diagramme de flux des patients inclus

Figure 50 : Un thromboélastomètre

Figure 51 : Les différents paramètres analysés sont en ROTEM

Figure 52 : Principe du dosage Luminex

Figure 53 : Schéma du système cône plan

Figure 54 : Configuration schématique de l'ektacytomètre

Figure 55 : Courbe de calcification des GRs en Oxygenscan.

Figure 56 : Syllectogramme

Figure 57 : Méthode de mesure de la TcPO₂

Figure 58 : Principe de la iontophorèse

Figure 59 : Exemple de courbe de laser Doppler en réponse à l'Acétylcholine

Figure 60 : Exemple de courbe de laser Doppler en réponse au courant

Figure 61 : Exemple de courbe de laser Doppler en réponse au chauffage

Figure 62 : Photo d'un ulcère actif d'un patient inclus

Figure 63 : Flux sanguin cutané de patients drépanocytaires avec et sans ulcères en réponse à l'Acétylcholine, au courant, et au chauffage

Figure 64 : Les marqueurs de cicatrisation

Figure 65A. Expression de l'ARNm par des cellules endothéliales incubées avec du plasma de patients sans ulcère et avec ulcère

Figure 65B. Ratio eNOS phosphorylée/eNOS ratio et ERK phosphorylée/ERK déterminée sur des cellules endothéliales incubées avec le plasma de patients avec ulcère et sans ulcère

Figure 66 : Comparaison des flux sanguins cutanés entre les 2 visites des patients ayant cicatrisé

Figure 67 : Comparaison des flux sanguins cutanés des patients cicatrisés avec les patients sans ulcère

Abréviations

2,3 DPG : 2,3-diphosphoglycerate

5HT : serotonine

A

AA : individus sains

ADMA : *asymmetrical dimethyl arginine*

ADP : adenosine diphosphate

ALAT : alanine amino transférase

AMM : autorisation de mise sur le marché

AS : individu porteur du trait drépanocytaire (hétérozygote)

ASAT : aspartate amino transferase

ATP : adenosine triphosphate

aPC : protéine C activée

AVC : accident vasculaire cérébral

B-C

BH4 : tetrahydrobioptéine

CD : cellule dendritique

CGRP : *Calcitonine Gene Related Peptide*

CO₂ : dioxyde de carbone

COX : cyclo oxygenase

CRISPR : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

CVO : Crise vaso occlusive

D-E

DAMPs : *Damage Associated Molecular Patterns*

DARC : *Duffy antigen receptor for chemokine*

EDHF : *endothelium derived hyperpolarizing factor*

EGFR : *epidermal growth factor receptor*

eNOS : *endothelial NO synthase*

ERK : *extracellular signal-regulated kinase*

EROs : espèces réactives de l'oxygène

ET : endothéline

F

FT : facteur tissulaire

FLG-2 : *filaggrin 2*

FIIa : thrombine

FVa : facteur V activé

FVIIIa : facteur VIII activé

FGF : *fibroblast growth factor*

G

G6PD : glucose 6 phosphodeshydrogenase

GABA : acide gamma aminobutyrique

GpIIbIIIa : glycoprotéine IIb IIIa

GMPc : guanosine monophosphate cyclase

GR : globule rouge

GST : glutathion S transferase

H

H₂O₂ peroxyde d'hydrogène

Hb : hémoglobine

HbA : hémoglobine A

HbF : hémoglobine foetale

HbS : hémoglobine S

HIF1 : *hypoxia inducible factor 1*

HLA : *human leucocyte antigen*

HO[•] : radical hydroxyl libre

HU : hydroxyurée

I

ICAM-1 : *inter cellular adhesion molecule 1*

IL-10 : interleukine 10

INF- γ : interféron gamma

iNOS : *inductible NO synthase*

M

MAPK : *mitogen activated protein kinase*

MEC : matrice extra cellulaire

MEOPA : mélange équimolaire d'oxygène et protoxyde d'azote

miRNA : *micro ribo nucleic acid*

MMP : *matrix metalloproteinase*

MPs : microparticules

N-O

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF- κ B : *nuclear factor -kappa B*

nNOS : *neuronal NO synthase*

NK : *natural killer*

NETs : *neutrophils extracellular traps*

NLRP3 : *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*

NO : oxyde nitrique

O₂ : oxygène

O₂^{•-} : anion superoxyde

P

PAMPs : *pathogen associated molecular patterns*

PDGF : *platelet derived growth factor*

PE : phycoérythrine

PGE2 : prostaglandine E2

PGH₂ : prostaglandine H2

PGI₂ : prostacycline

PI3 kinase : phosphoinositide 3-kinase

PKC : protéine kinase C

PO₂ : pression partielle en oxygène

PPAR : *peroxysome activated receptors*

PPRs : *pattern recognition receptors*

PS : phosphatidyl serine

PTGS : prostaglandines G/H synthases

R-S

ROS : *reactive oxygen species*

SMAD : *mothers against decapentaplegic homolog*

SNP : *single nucleotid polymorphism*

SP : Substance P

SS : patient drépanocytaire homozygote SS

STA : syndrome thoracique aigue

T

t-PA : *tissular plasminogen activator*

TCM : lymphocyte T mémoire centrale

TEM : lymphocyte T mémoire effecteur

TIMP : *tissue inhibitor of MMP*

TFPI : *tissular factor plasma inhibitor*

TGF- β : *transforming growth factor – beta*

TLR : *toll like receptor*

TM : thrombomoduline

TNF- α : *tumor necrosis factor alpha*

Tregs : lymphocytes T régulateurs

TXA2 : thromboxane A2

V

VCAM-1 : *vascular cell adhesion molecul-1*

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

VIP : *vasoactive intestinal peptide*

vWF : *von Willebrand factor*

Introduction

Le médecin vasculaire est amené à prendre en charge les plaies vasculaires. Ces plaies sont le plus souvent localisées aux membres inférieurs et cicatrisent grâce à une revascularisation pour les plaies artérielles et à un contrôle de l'œdème pour les plaies veineuses. C'est tout naturellement que l'unité de médecine vasculaire de l'Hôpital Edouard Herriot a pris en charge les plaies des patients drépanocytaires qui ne rentrent dans aucune de ces 2 cases mais répondent souvent bien à un traitement proche de celui des patients insuffisants veineux. L'unité a maintenant une expérience conséquente comme l'unité de médecine vasculaire appartient au service de médecine interne qui abrite un centre de référence des maladies des globules rouges.

La drépanocytose (SS) est une hémoglobinopathie héréditaire et la première des maladies génétiques dans le monde. Les globules rouges (GRs) de ces patients sont plus fragiles et moins déformables. Les patients drépanocytaires SS souffrent notamment d'une anémie hémolytique chronique en lien avec la fragilité des GRs, de crises vaso-occlusives douloureuses et de complications vasculaires multi-sites dont les ulcères de jambe. Les altérations des GRs entraînant une hémolyse chronique, une inflammation, des anomalies de la coagulation et une diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (nitric oxide (NO) en anglais) conduisent à une dysfonction vasculaire. La survenue des ulcères de jambe est imprévisible et mal comprise et la fonction micro vasculaire des patients drépanocytaires n'a jamais été étudiée en fonction de la présence ou l'absence d'ulcère. De la même manière, la coagulation n'a pas été étudiée chez les patients drépanocytaires en fonction de leur statut ulcère de jambe. Les quelques publications inhérentes aux ulcères de jambe chez les patients drépanocytaires montrent notamment, en histologie, une activation endothéliale, des micro thromboses et un infiltrat inflammatoire, et une abolition du réflexe veino artériolaire. La littérature a associé les ulcères de jambe à une hémolyse plus importante et à une altération plus importante de la rhéologie des GRs chez des patients drépanocytaires non traités. Enfin, des anomalies de la coagulation ont été rapportées dans d'anciens cas d'études de patients drépanocytaires avec ulcères de jambes.

Dans l'objectif de comprendre pourquoi certains patients drépanocytaires font des ulcères et d'autres non, l'étude DrépanO2 a inclus 69 patients atteints de drépanocytose cliniquement stables, sous traitement modifiant la maladie. Nous avons étudié les paramètres d'hémolyse et viscosité pour caractériser le phénotype. Nous avons complété la recherche étiologique sur des pistes non encore explorées comme la fonction microcirculatoire (pression transcutanée en oxygène et flux sanguin cutané mesuré par laser Doppler fluxmétrie) et nous avons testé des paramètres de coagulation. Nous avons également cherché à savoir si la présence d'ulcères de jambe faisait varier les paramètres

inflammatoires chez les patients drépanocytaires et pourrait expliquer le retard de cicatrisation. Dans cette même optique, du plasma de patient avec ou sans ulcères a été appliqué sur des cultures de cellules endothéliales afin d'évaluer un éventuel effet délétère sur les cellules endothéliales. Nous avons également étudié des voies de signalisation de la vasodilatation.

Partie 1. Revue de la littérature

Chapitre 1 – Hémorhéologie et globule rouge

I. Hémorhéologie

La rhéologie sanguine ou hémorhéologie est l'étude des propriétés physiques et dynamiques du sang et de ses constituants (1). Le sang est constitué de 2 phases ; les caractéristiques rhéologiques du sang sont déterminées par les propriétés de chacune et leur contribution relative au volume sanguin total. Ces 2 phases sont : le plasma contenant eau, protéines, sels et molécules organiques et les cellules, représentées à 99% par des GRs. Les GRs sont donc l'élément majeur contribuant à la rhéologie sanguine. L'écoulement se fait sous un régime diphasique, avec au voisinage des parois du vaisseau, une zone marginale (couche plasmatisque) appauvrie en particules et une région axiale enrichie en cellules et particules.

La rhéologie sanguine est déterminante dans la régulation du flux sanguin. La vitesse d'un flux dans un tube dépend de la pression et de sa résistance à l'écoulement, comme formulé dans la loi de Poiseuille.

Toutefois, le sang est un **liquide non newtonien** où la viscosité n'est pas constante. La viscosité du sang dépend de la vitesse de cisaillement à laquelle il est soumis, elle-même augmentant avec le débit sanguin et diminuant avec l'augmentation du rayon vasculaire sujet à la vasomotricité. La vitesse de cisaillement est de 200 s^{-1} dans l'aorte ascendante, $>1000 \text{ s}^{-1}$ dans les artérioles et capillaires puis de quelques s^{-1} dans les veines caves (2)

Le sang est dit **rhéofluidifiant** : la viscosité diminue avec l'augmentation de la vitesse de cisaillement (3). (Figure 1).

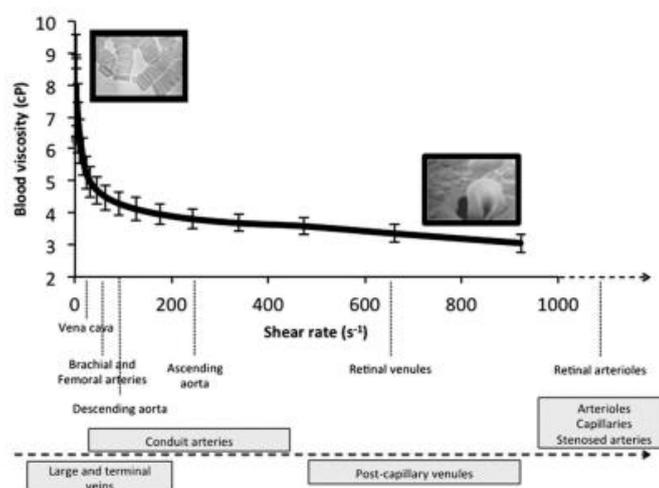


Figure 1 : Effet de la vitesse de cisaillement et des propriétés des GRs sur la viscosité sanguine (4)

In-vivo, la viscosité sanguine dans la microcirculation dépend aussi de l'**effet Fåhræus** et **Fåhræus-Lindqvist** (5). En effet, l'écroulement plasmatique qui survient à chaque bifurcation de la microcirculation aboutit à une diminution de l'hématocrite localement, conduisant à une baisse de viscosité du sang. Ce phénomène est observable pour des diamètres vasculaires compris entre 6 μm et 1 mm. Cependant en dessous de 6 μm de diamètre, les globules rouges circulent en file indienne aboutissant à une proportion de plasma plus faible que la proportion de globules rouges. Cela cause une ré-augmentation de l'hématocrite localement, et ainsi de la viscosité sanguine.

Quand le vaisseau est inférieur à 3 μm de diamètre la quasi-totalité du vaisseau est occupée par les érythrocytes en forme de parachute, il en résulte une augmentation de la viscosité sanguine et une dépendance importante de cette viscosité sanguine vis-à-vis des propriétés de déformabilité des GRs.

A basse vitesse de cisaillement, la viscosité du sang dépend principalement des propriétés d'agrégation des GRs et de l'hématocrite. A haute vitesse de cisaillement, elle est principalement dépendante de la déformabilité des GRs. Le flux sanguin déforme les GRs entraînant un stockage d'énergie élastique provenant de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (6).

De plus, la viscosité du sang diminue au cours du temps d'exposition à une vitesse de cisaillement donnée (7), c'est ce qu'on appelle la **thixotropie** (Figure 2).

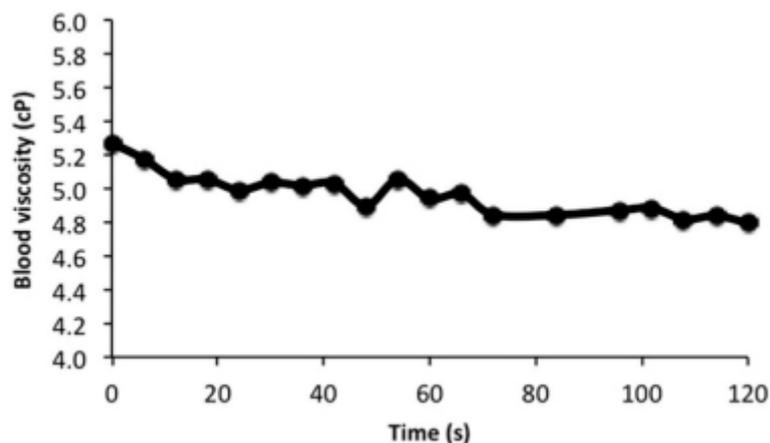


Figure 2: Evolution de la viscosité sanguine au cours du temps et à une vitesse de cisaillement fixe (4)

Ainsi la viscosité sanguine dépend de l'hématocrite, de la viscosité plasmatique et des propriétés d'agrégation et de déformabilité des GRs (8). Le plasma est, lui, un fluide newtonien ; sa viscosité est indépendante de la vitesse de cisaillement. La viscosité plasmatique dépend essentiellement de la concentration en fibrinogène, α 1-globuline, α 2-globuline et γ -globuline (9). En cas d'inflammation par exemple, l'augmentation de la viscosité plasmatique augmente la viscosité sanguine, modulant la production de NO par les cellules endothéliales et donc le flux sanguin (2).

II. Globule rouge

Les globules rouges (GRs) aussi appelés érythrocytes constituent environ la moitié du volume du sang et sont le type cellulaire le plus abondant chez l'humain. Leur forme physiologique est discoïde, biconcave du fait d'un excès de surface et d'un cytosquelette complexe (Figure 3). Grâce à ceci et à l'absence de noyau, les GRs peuvent transporter beaucoup d'oxygène, ont une grande surface d'échange et une déformabilité importante. Cette déformabilité leur permet de franchir des capillaires de diamètre inférieur au leur et de résister aux contraintes mécaniques de la circulation sanguine.

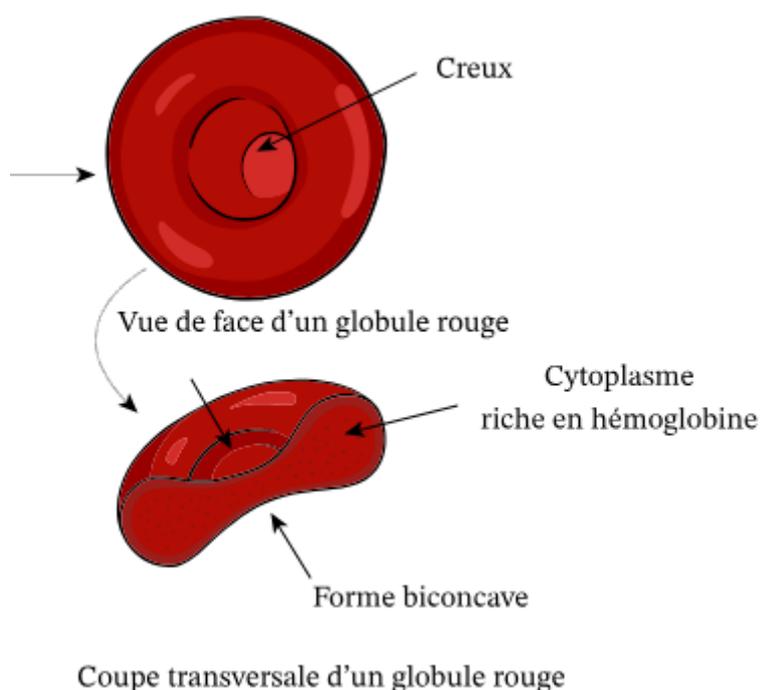


Figure 3 : Schéma de la structure d'un globule rouge
(www.nagwa.com/fr/explainers/925179056904/)

Les GRs sont produits par érythropoïèse (Figure 4) . Elle se fait dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques multipotentes. La perte du noyau se fait au stade d'érythroblaste acidophile. Le réticulocyte est un GR immature libéré dans la circulation. La synthèse d'hémoglobine se fait tout au long du processus de différenciation et s'arrête avec la maturation en GR (10). Au stade réticulocytaire circulant, la synthèse d'hémoglobine est à son maximum. Le principal facteur régulateur est l'érythropoïétine, synthétisée par le cortex rénal en réponse à une hypoxie.

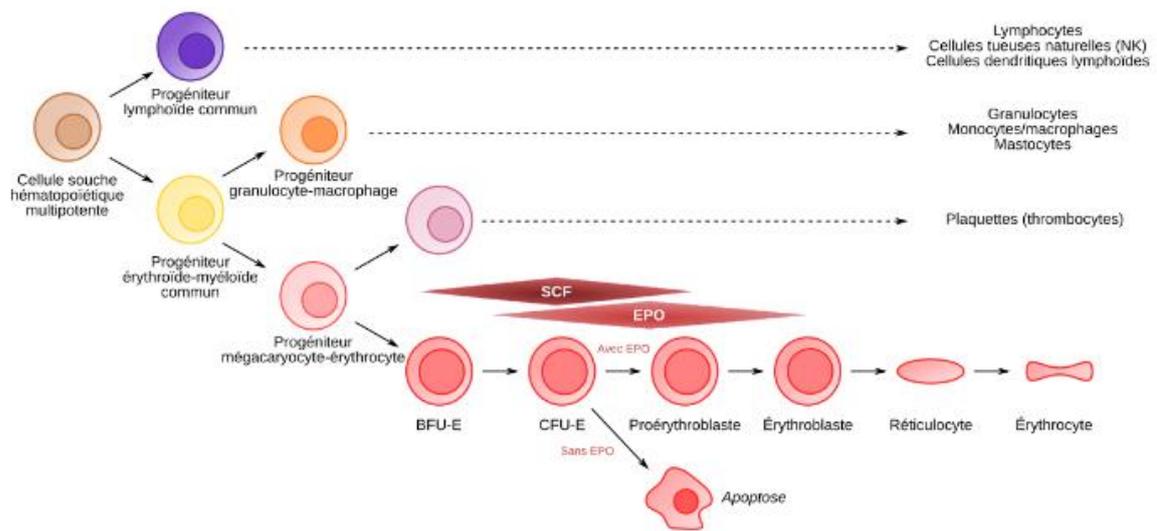


Figure 4 : Les étapes de l'érythropoïèse (www.planet-vie.ens.fr)

La durée de vie normale d'un GR est de 120 jours ; ils sont ensuite phagocytés par les macrophages en réponse à l'exposition de phosphatidyl sérine (PS) sur la membrane. La phagocytose a lieu principalement dans la rate mais également dans le foie et la moelle osseuse.

Leur rôle principal est d'apporter l'oxygène aux tissus puis le dioxyde de carbone aux poumons (11). L'oxygène circule dans le sang fixé à la protéine hémoglobine. En dehors d'un GR, l'hémoglobine libre est oxydée et perd sa capacité à transporter l'oxygène.

1. Agrégation érythrocytaire

Les GRs ont la particularité de s'agréger entre eux en fonction des conditions hémodynamiques, notamment en cas de vitesse de cisaillement basse dans les veines. Ils forment des rouleaux comme une pile de jeton (Figure 5).

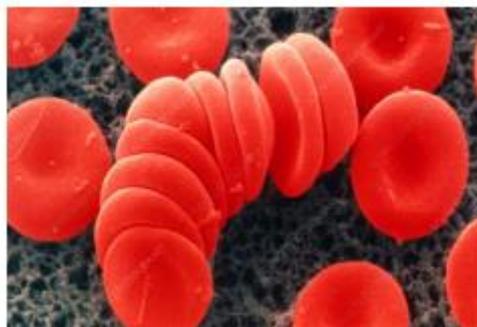


Figure 5 : Globules rouges agrégés en rouleaux (www.sciencephoto.com)

Cette interaction est réversible. Il existe 2 théories expliquant ces interactions. La *bridging theory* soutient que la formation d'agrégats serait due à un pont en facteurs plasmatiques et macromolécules (comme le fibrinogène) entre les GRs. La théorie de la déplétion s'explique par le rôle de la pression osmotique liée à la concentration en protéines plasmatiques et macromolécules (comme le fibrinogène) (12).

Les agrégats érythrocytaires sont rapidement rompus lorsque le sang traverse des territoires vasculaires à vitesse de cisaillement plus importante. L'agrégation des GRs est modulée par le glycocalyx à la surface des GRs ; il contient des glycoprotéines avec de l'acide sialique et des protéoglycanes fait de glycosaminoglycanes attachés de manière covalente aux protéines (13). La quantité d'acide sialique, chargée négativement, joue un rôle dans la répulsion des GRs entre eux. Le fibrinogène participe également en formant des ponts entre 2 cellules voisines (14).

Dans les territoires à haute vitesse de cisaillement, l'agrégation érythrocytaire favorise la migration centrale des GRs, augmentant la largeur de la zone sans cellule à la périphérie du flux (15). Ceci entraîne une diminution de la viscosité apparente et des résistances vasculaires, une diminution de la contrainte de cisaillement sur les vaisseaux et donc une baisse d'activation de la eNOS (NO synthase endothéliale).

2. Déformabilité érythrocytaire

Le globule rouge, mesurant 7 μm , doit traverser des vaisseaux, comme les capillaires avec un diamètre parfois $<5 \mu\text{m}$, nécessitant une grande déformabilité. Il doit pouvoir se déformer sans se rompre. La membrane des GRs est très élastique (100 fois plus élastique qu'une membrane de latex), répond très rapidement à un stress mécanique (de l'ordre de 100 msec) et est plus forte que l'acier. La déformabilité dépend :

- Du rapport surface/volume : un excès de surface par rapport au volume permet à la cellule de se déformer sans se rompre
- De l'élasticité membranaire et sous membranaire due aux protéines membranaires et au cytosquelette (16)
- De la viscosité interne, dépendant elle-même de l'état d'hydratation du GR et du type d'hémoglobine

Dans un milieu plus visqueux que le plasma, l'augmentation de la vitesse de cisaillement déforme les GRs en ellipse et la membrane tourne autour du cytosol (tank-treading motion). Il est supposé que ce phénomène faciliterait l'alignement des GRs dans le sens du flux afin de limiter les résistances et

diminuer la viscosité sanguine (17). A l'inverse, la hausse de viscosité sanguine due à la baisse de déformabilité érythrocytaire viendrait de l'incapacité des GRs à s'aligner dans le flux sanguin ; la membrane n'étant pas capable de tourner autour du cytosol pour faciliter l'alignement des cellules dans le sens du flux. Ces GRs peu déformables circuleraient de façon perpendiculaire au flux sanguin, ce qui augmente la résistance vasculaire. Toutefois, dans un milieu dont la viscosité est proche de celui du plasma, ce phénomène est moins observé. Les GRs adoptent des formes variées : ellipse rigide à basse vitesse de cisaillement jusqu'à polylobés à haute vitesse de cisaillement (18), ce qui faciliterait la réduction de la viscosité sanguine à haut cisaillement.



Figure 6 : Erythrocyte se déformant pour franchir un capillaire (<https://extranet.rrmechatronics.com/>)

III. Hémoglobine

L'hémoglobine est la principale protéine composant les GRs. Il s'agit d'un pigment respiratoire de la famille des métalloprotéines (celle-ci contient du fer). Le terme « hémoglobine » désigne toute protéine porteuse d'un noyau porphyrrique se liant de manière irréversible à l'oxygène sans modification du niveau d'oxydation du fer. Les bactéries, les levures, les plantes, les eucaryotes et l'ensemble du règne animal sont pourvus d'hémoglobine.

Chez les individus sains, elle est constituée de 2 chaînes α -globine et de 2 chaînes β -globine assemblées en un tétramère de 2 dimères $\alpha\beta$. Chaque chaîne renferme un groupement hème relié à un atome de fer fixant une molécule d'oxygène (O_2). Chaque hémoglobine peut donc contenir au maximum 4 molécules d' O_2 .

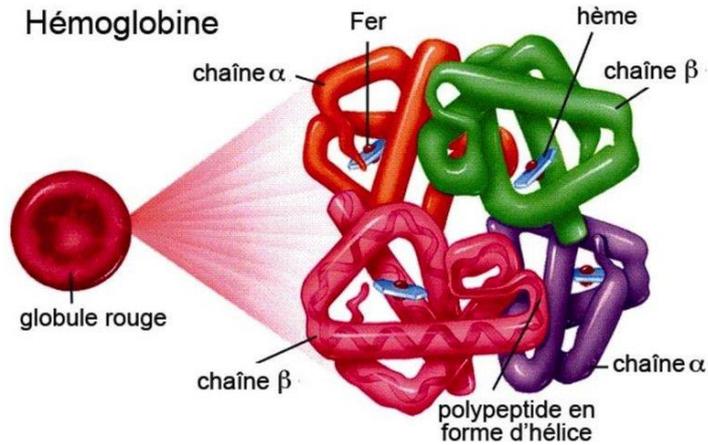


Figure 7 : Structure d'une molécule d'hémoglobine (<http://therapiegeniqueetbetathalassemie.wordpress.com/>)

La synthèse des chaînes de globine est codée par des gènes divisés en 2 clusters respectivement α (sur le chromosome 16) et β (sur le chromosome 11). L'expression de ces gènes varie de façon séquentielle au stade embryonnaire, au stade fœtal et au stade adulte (Figure 8).

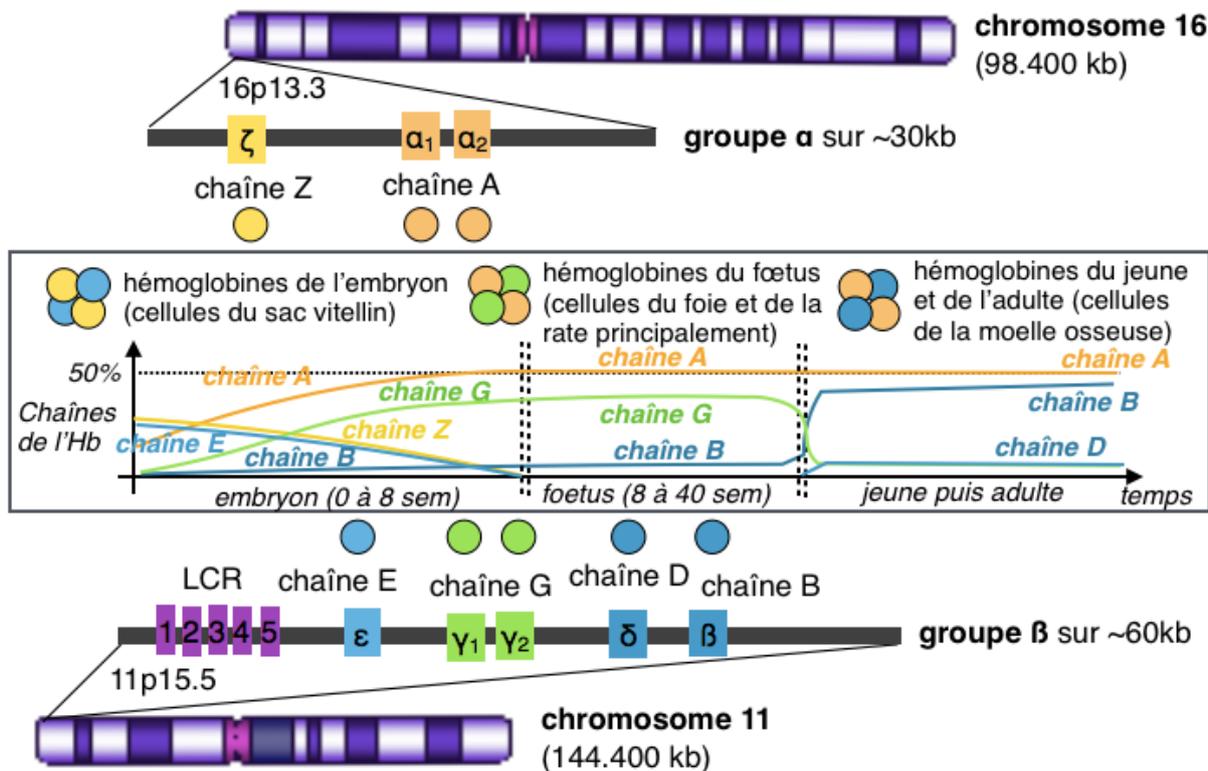


Figure 8 : Structure des différents gènes de globine (<http://pst.chez-alice.fr/protso.htm>)

L'hémoglobine fœtale (HbF, $\alpha_2 \gamma_2$) est exprimée de manière majoritaire au stade fœtal et durant les premiers mois de vie. L'HbF délivre l'oxygène depuis le sang maternel à la circulation fœtale, justifiant une plus grande affinité pour l'oxygène.

A partir de la naissance, l'hémoglobine A (HbA, $\alpha_2 \beta_2$) devient progressivement majoritaire jusqu'à atteindre 97%, associée avec une minorité d'hémoglobine A2 (HbA2, $\alpha_2 \delta_2$).

La saturation en O₂ représente le pourcentage d'hémoglobine qui fixe l'O₂. La relation entre pourcentage d'hémoglobine ayant fixée l'O₂ et la pression partielle en O₂ (PO₂) suit une courbe de saturation qui peut varier en fonction de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène, c'est-à-dire sa propension à lier un oxygène ou à le libérer. La détermination de la P50, PO₂ pour laquelle 50% de l'hémoglobine est fixée à l'O₂, permet d'évaluer cette affinité. L'affinité de l'hémoglobine est modulée par différents facteurs physiologiques. L'augmentation de la pression partielle en CO₂ ou la diminution du pH diminuent l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène : la courbe est décalée vers la droite ; il s'agit de l'effet Bohr. A l'inverse, la baisse de température, la diminution de la PCO₂ ou l'augmentation du pH augmentent l'affinité de l'O₂ pour l'oxygène et décalent la courbe vers la gauche ; il s'agit de l'effet Haldane (19) (Figure 9).

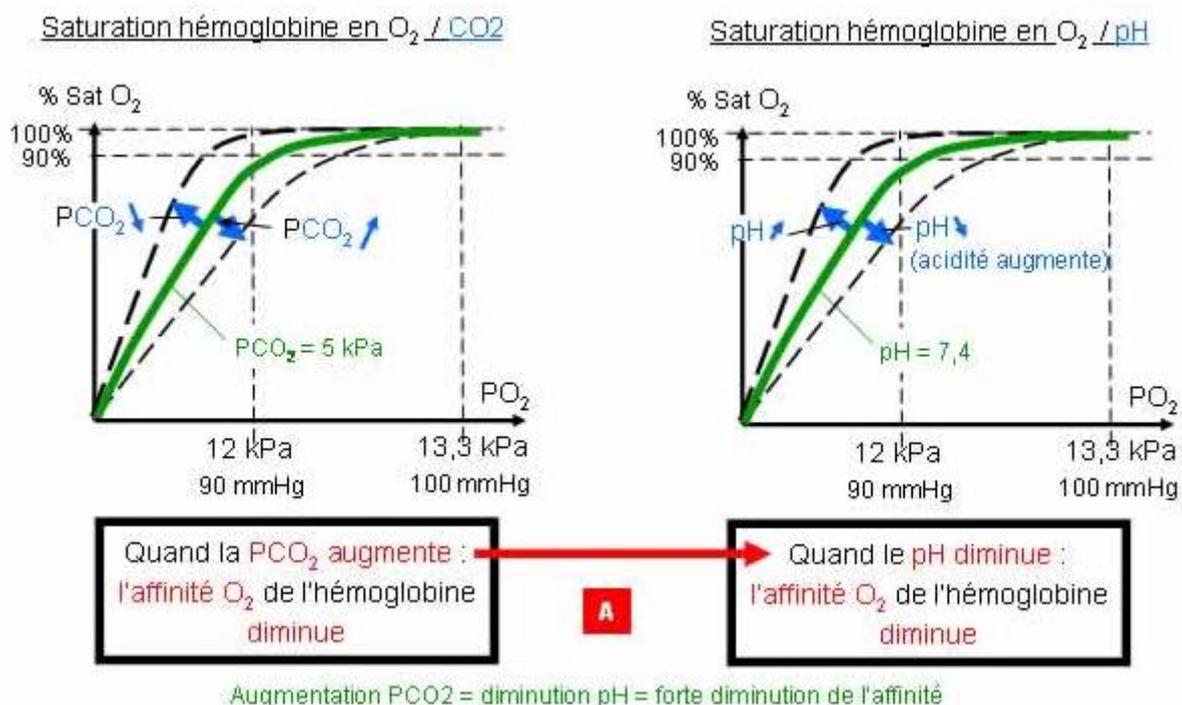


Figure 9 : Facteurs influençant la dissociation de l'hémoglobine pour l'oxygène
(http://www.dilingco.com/DilingcoPro/contenttf/physio3_3.htm)

L'affinité varie en fonction du type d'hémoglobine considérée. Il existe des variants génétiques d'hémoglobine hyper affine à l'origine de polyglobulies ou d'hémoglobine hypo affine menant à une hypoxémie (20).

IV. Hémoglobinopathies

Les hémoglobinopathies regroupent l'ensemble des pathologies liées à une anomalie génétique de la synthèse de l'hémoglobine. Elles se divisent en 2 types.

- Anomalies quantitatives : les thalassémies correspondant à une absence ou diminution de la synthèse des chaînes α ou β de l'hémoglobine.
- Anomalies qualitatives de la synthèse de l'hémoglobine

1. Thalassémies

Les α thalassémies correspondent à une anomalie sur les gènes codant l' α -globine. Elle peut concerner un seul, 2 ou 3 globines α . La mutation des 4 gènes est incompatible avec la vie.

Les β thalassémies correspondent à une anomalie sur les gènes codant la β -globine. La forme β^0 correspondant à une absence totale de production de chaîne β . Les formes β^+ correspondant à une anomalie d'un à 3 globines β .

Ces pathologies sont le plus souvent responsables d'une anémie chronique plus ou moins sévère en fonction du nombre de globines β touchées.

2. Anomalies qualitatives de l'hémoglobine

Elles entraînent un retentissement clinique variable en fonction de la forme. La drépanocytose SS est responsable d'une anémie hémolytique, les hémoglobines hyper-affines d'une polyglobulie et les hémoglobines hypo-affines d'une cyanose.

Les syndromes drépanocytaires majeurs correspondent à une mutation des 2 gènes codant pour la chaîne β de l'hémoglobine avec l'une des 2 entraînant la synthèse d'hémoglobine S (HbS).

2.1 Drépanocytose SS

Il s'agit de la forme homozygote des syndromes drépanocytaires majeurs, aboutissant au phénotype le plus sévère. Elle correspond à l'inversion d'un résidu adénine par un résidu thymine sur les 2 allèles du chromosome 11, sur le 7^e acide aminé de la chaîne β , menant au remplacement de l'acide

glutamique par une valine. Les symptômes sont une anémie hémolytique chronique, des crises vaso occlusives et différentes atteintes vasculaires d'organes.

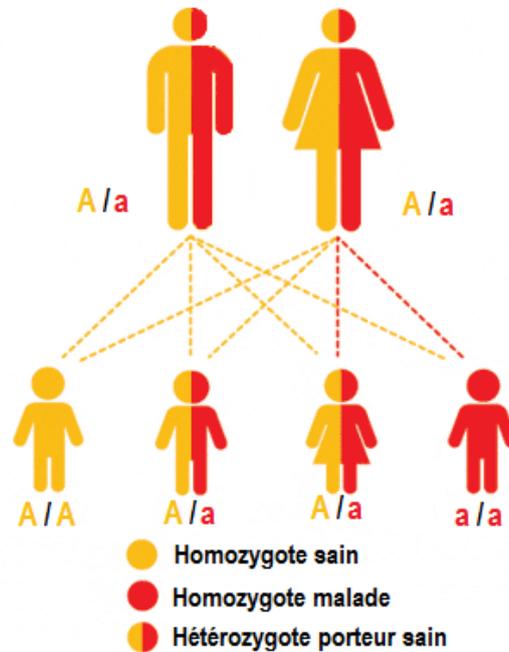


Figure 10 : Mode de transmission autosomique dominant

On appelle, porteur du trait drépanocytaire, les sujets hétérozygotes exprimant à la fois HbA et HbS. Ce trait drépanocytaire serait associé à des complications vasculaires, de rares crises vaso occlusives (21) et pourrait aggraver les complications vasculaires de pathologies comme le diabète de type 2 (22).

2.2 Drépanocytose SC

L'hémoglobine C est le 2^e variant le plus fréquent après l'HbS. L'hémoglobine C est due à la substitution d'une guanine par une adénine au niveau du 19^e nucléotide du gène de la β globine, entraînant un remplacement d'un acide glutamique par une lysine. Elle favorise la polymérisation de l'HbS par déshydratation du GR et augmentation de la densité des GRs (23). Cela proviendrait d'une altération du GR à ressentir son propre état d'hydratation. Le GR ressent une fausse hyperhydratation et active des mécanismes pour perdre de l'eau et des solutés. Il existe également un efflux anormal d'ions K^+ (22).

Le traitement repose sur des saignées régulières pour limiter l'hyperviscosité sanguine.

2.3 β -thalasso-drépanocytose

Le type dépend de la sévérité de la thalassémie associée à l'allèle β^S . Les patients $S\beta^0$ ne synthétisent que de l'HbS et ont un phénotype similaire aux patients SS. Les patients $S\beta^+$ synthétisent également de l'HbA, aboutissant à un phénotype moins sévère.

2.4 Syndromes drépanocytaires majeurs composites

L'Hb D-Punjab (Inde) renforce la polymérisation de l'HbS (24). Une glutamine substitue un acide glutamique en position 121 de la chaîne de globine β . Les individus hétérozygotes S/D-Punjab présentent des complications proches de celles des patients drépanocytaires SS alors qu'à l'état homozygote, l'Hb D-Punjab est quasiment asymptomatique.

L'Hb O-Arab (Afrique) potentialise la polymérisation de l'HbS et stabilise les polymères menant à la formation de GRs falciformés de manière irréversibles (25). Elle provient du remplacement de la glutamine en position 121 par une lysine. Cela modifie la charge de l'Hb O-Arab qui devient hautement chargée positivement et accumule des charges négatives sur le GR. Associée à l'HbS, elle mène à une forme sévère de drépanocytose.

L'HbE (sud-est asiatique) correspond à une β -thalassémie en ce sens qu'elle réduit la synthèse d'HbE (26). L'acide glutamique en position 26 est remplacé par une lysine. Cela entraîne un épissage alternatif entraînant la diminution de synthèse d'ARNm β . Elle serait responsable d'un phénotype proche de la $S\beta^+$ thalassémie.

Chapitre 2– La drépanocytose SS

I. Historique

En 1910, des GRs en forme de faucilles ont été décrits pour la première fois (Figure 11). Le terme drépanocytose vient du grec *drepanon*, signifiant faux/faucille. En 1929, E. Vernon Hahn et Elizabeth Gillespie découvrent que le processus de falciformation est réversible et qu'il survient uniquement pour une pression en O₂ dans le sang inférieure à 50 mmHg. L'année suivante, Diggs montre l'obstruction capillaire par les GRs falciformés. En 1940, la responsabilité d'une hémoglobine anormale est établie. Cette HbS est identifiée par Pauling (27). L'acide aminé est identifié en 1958 et la mutation génétique en 1963 (28).

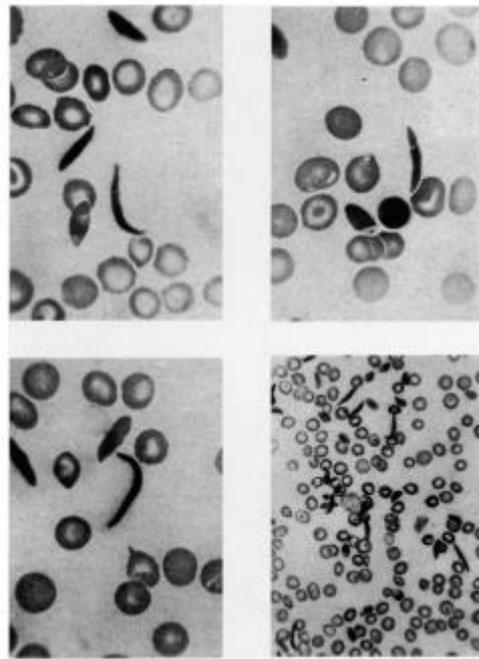


Figure 11 : Frottis sanguin réalisé par le Dr Herrick chez un patient atteint d'anémie sévère et d'un syndrome pulmonaire grave (Herrick 1910).

II. Epidémiologie

A l'origine, la mutation β^S est très fréquente dans les zones où le paludisme est endémique : Afrique sub-saharienne, Inde et Moyen Orient. En effet, la persistance du gène de l'HbS est due à l'avantage sélectif qui diminuerait le risque de formes graves de paludisme de 90 % chez les individus en cas de

mutation hétérozygote (29). Les GRs des sujets hétérozygotes subiraient une érythro phagocytose plus importante du fait d'un stress oxydant majoré, perturbant le développement du parasite, sa propagation et entraînant une élimination plus efficace (30,31).

En 2013, il a été rapporté un nombre annuel de plus de 80 000 naissances d'enfants drépanocytaires homozygotes au Nigeria (32). L'esclavage et les flux migratoires du 20^e siècle ont conduit à l'arrivée de sujets porteurs de la mutation β^S en Europe et en Amérique du Nord. Le nombre de naissance annuelle de patient drépanocytaire homozygote est de 1000 aux Etats Unis et de 500 environ en France (32).

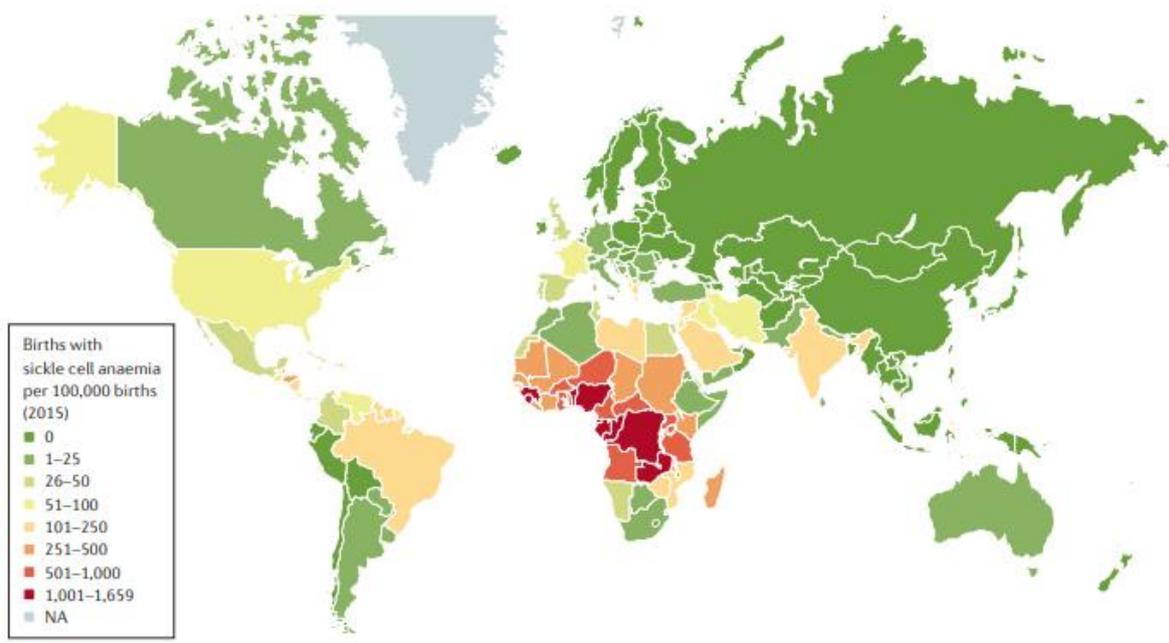


Figure 12 : Carte du nombre estimé de naissances avec drépanocytose SS en 2015 (33).

III. Diagnostic

Le diagnostic peut être réalisé avant la conception, en prénatal, néonatal ou plus tard.

1. Diagnostic enfant/adulte

Différentes techniques permettent de séparer les hémoglobines dans le sang : électrophorèse, chromatographie en phase liquide ou focalisation isoélectrique. La caractérisation de l'hémoglobine permet également d'évaluer l'efficacité des traitements. Le génotype n'est pas réalisé de manière systématique (Figure 13).

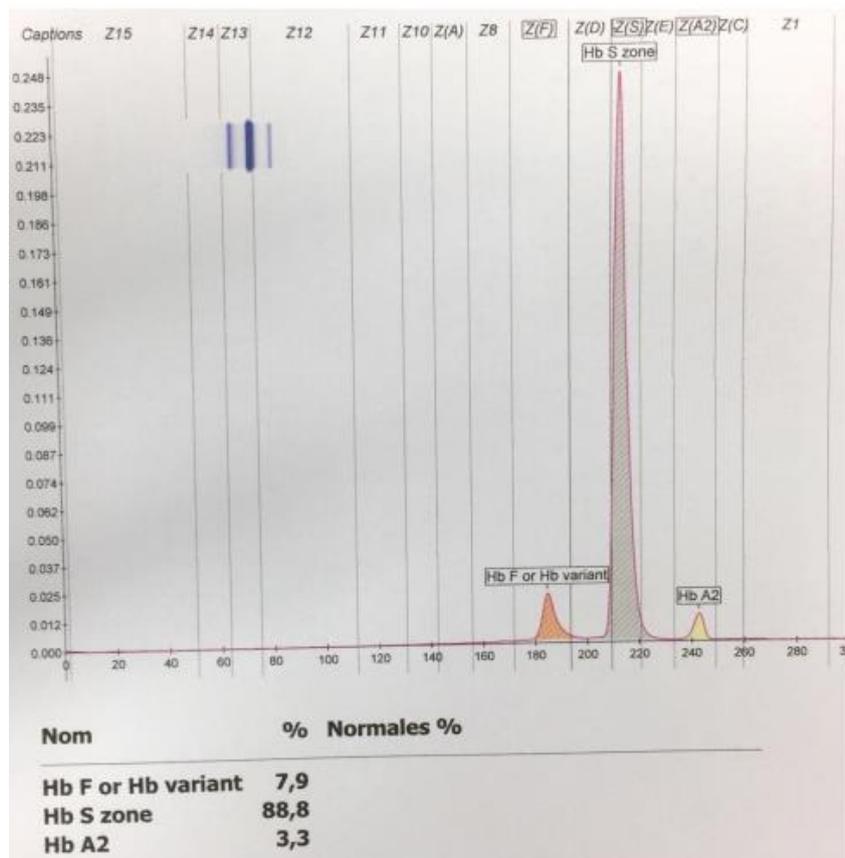


Figure 13 : Exemple d'une électrophorèse de l'hémoglobine par électrophorèse capillaire chez un patient drépanocytaire SS (réalisé au Centre de Biologie et Pathologie Est, HCL)

2. Diagnostic avant la conception

Il permet d'identifier les parents porteurs du trait drépanocytaire (AS). Dans le cas où les 2 parents sont AS, le risque de donner naissance à un enfant drépanocytaire de génotype SS est de 25%.

3. Diagnostic prénatal

En cas de dépistage du trait drépanocytaire chez les 2 parents, une ponction de villosité chorale peut être réalisée à la 9^e semaine de gestation. L'analyse se fait par biologie moléculaire. Au besoin, la fertilisation in vitro permet de sélectionner un embryon non porteur de la mutation.

4. Diagnostic néonatal

Il est réalisé de manière systématique aux Antilles depuis 1984 et plus récemment en Guyane, à Mayotte et sur l'île de la Réunion. En métropole, le dépistage est devenu universel depuis 2022.

IV. Physiopathologie de la drépanocytose

1. Polymérisation de l'HbS

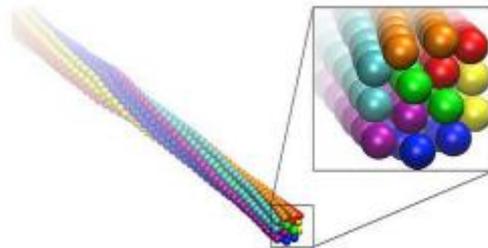


Figure 14 : Fibre d'Hémoglobine S (36)

L'HbS a une affinité réduite pour l'oxygène par rapport à l'HbA. Cette moindre affinité favorise la polymérisation de l'HbS en favorisant sa forme désoxygénée (37). Ce phénomène est renforcé par la production accrue de 2,3 DPG (2,3-diphosphoglycérate), comme en cas de déficit en pyruvate kinase (38), d'augmentation de la température en lien avec sepsis ou un effort physique et l'augmentation de la concentration en HbS en cas de déshydratation. L'acide 2,3-DPG est une substance présente à l'intérieur GR responsable de la réduction de l'affinité de l'Hb pour l'oxygène ; il se lie à l'Hb pour faciliter la délivrance d'oxygène aux tissus.

L'état d'hydratation du GR est le facteur principal modulant la concentration intracellulaire en HbS. Trois canaux sont impliqués dans ce phénomène : Psickle, Gardos et le co transporteur KCl (Figure 15) (39). Récemment, 2 études ont montré que les protéines Piezo1 et TRPV2, présents à la surface des globules rouges, pourraient jouer un rôle clef dans la voie Psickle, la déshydratation et la falciformation érythrocytaire (40,41).

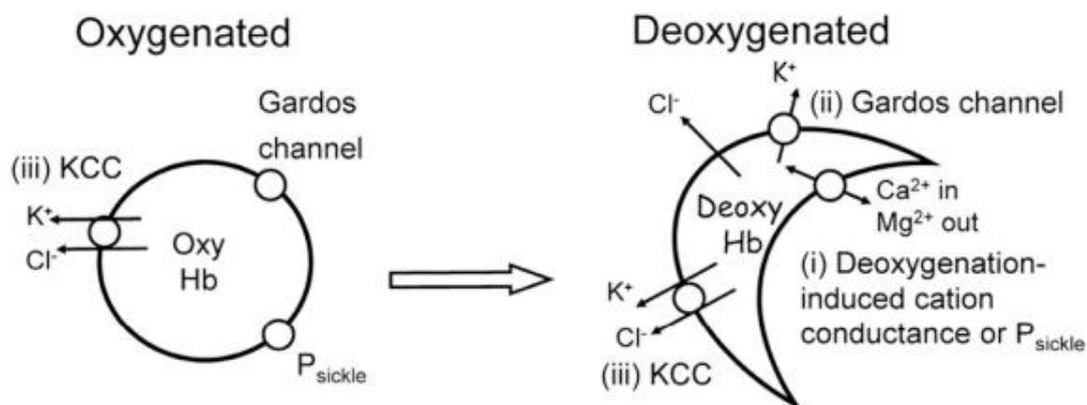


Figure 15 : Représentation des mécanismes menant à la déshydratation du GR drépanocytaire en condition désoxygénée (40).

En condition désoxygénée, l'HbS polymérise, falciforme le GR et active (i) Psickle, un canal cationique induit par la désoxygénation ; son effet principal est de faire rentrer le Ca^{2+} , ce qui active une 2^e voie de transport, (ii) le canal Gardos ou canal K^+ activé par le Ca^{2+} , qui entraîne une perte d'une quantité importante de K^+ .

En condition oxygénée, Psickle et Gardos sont inactifs. (iii) Un efflux de K^+ et Cl^- passe par le co transporteur KCl. Il est plus actif dans les GRs HbS par rapport aux GRs HbA. Ce canal reste actif en condition désoxygénée ; la perte de Mg^{2+} par Psickle augmente son activité.

2. Anomalies vasculaires

La falciformation a lieu dans des territoires vasculaires désoxygénés : capillaires, veines et veinules. Les GRs ralentissent dans ces territoires, ce qui leur laisse davantage de temps pour falciformer. Ce ralentissement s'explique, d'une part, par la difficulté du GR à se déformer pour passer dans les petits vaisseaux et, d'autre part, par l'augmentation de l'adhérence des GRs HbSS à l'endothélium, ce qui va perturber le flux sanguin et causer un allongement du temps de transit des GRs dans la microcirculation, laissant alors le temps à l'HbS de polymériser et les GRs de falciformer bloquant ainsi le flux sanguin.

2.1 Altération de la membrane des GRs

Les cycles répétés de polymérisation-dépolymérisation de l'HbS ainsi que le stress oxydant secondaire à l'hémolyse altèrent la membrane du GR. Ceci accroît la déshydratation cellulaire, l'adhérence, l'hémolyse et la sénescence (41,42). Le stress oxydant entraîne l'exposition de la PS, participant à l'élimination précoce des GRs par les macrophages (43). La durée de vie des GRs drépanocytaires est diminuée à 25 jours contre 120 jour pour des GRs sains (44).

Certaines cellules qui ont accumulé trop de dommages à la suite de cycles de polymérisation-dépolymérisation répétés vont rester falciformées de manière irréversible. Ces cellules sont très denses, déshydratées et peu déformables (45).

2.2 Hémolyse

Hémolyse extravasculaire

Il s'agit du processus physiologique d'élimination des GRs en sénescence ou ayant accumulé trop de lésions : l'éryptose. L'objectif est d'éviter l'hémolyse intra vasculaire qui libérerait un contenu dommageable (46). Ces GRs sont pris en charge par les monocytes et macrophages du système réticulo endothélial, principalement au niveau de la rate et du foie. Les GRs à éliminer sont sélectionnés selon la balance entre la PS externalisée sur les GRs sénescents et le CD47 exprimant le signal *do not eat me* (47) qui diminue avec la sénescence des GRs.

L'afflux de Ca^{2+} , par altération membranaire, mène à l'activation de canaux potassiques calcium-dépendant, en particulier le canal Gardos (48). Il s'en suit la sortie de K^+ , Cl^- et eau aboutissant à la déshydratation du GR et à sa contraction. Le stress oxydant active les canaux Cl^- menant également à une **déshydratation cellulaire** (49).

L'augmentation de la concentration cellulaire en Ca^{2+} entraîne une **rupture de l'asymétrie des phospholipides membranaires** en inhibant la flippase et en activant la floppase et la scramblase, menant à une translocation accrue de PS vers le feuillet externe (50). En condition physiologique, la PS et la phosphatidyléthanolamine sont maintenues sur le feuillet interne tandis que la phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont présentes sur le feuillet externe de la membrane.

Également, le Ca^{2+} active des protéases comme la caspase 3 et la calpaïne qui **dégradent la bande 3** et ses interactions avec le cytosquelette ; cela pourrait être à l'origine de **l'émission de microparticules (MPs)** par bourgeonnement cellulaire (51). Les MPs sont de petites vésicules à membrane relarguées par différents types cellulaires en réponse à leur activation ou l'apoptose. La bande 3 est un transporteur anionique jouant un rôle essentiel dans l'homéostasie du CO_2 et un site de fixation pour de nombreuses autres protéines membranaires et du cytosquelette (52). Ce phénomène de dissociation de la bande 3 est également favorisé par la précipitation de l'hémoglobine oxydée et dénaturée formant des EROs (espèces réactives de l'oxygène).

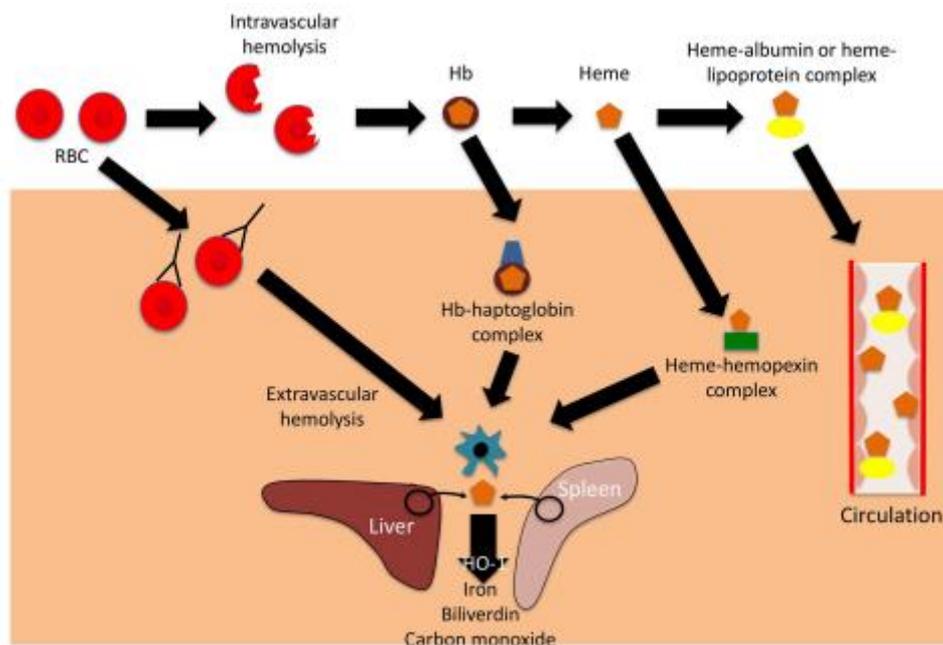


Figure 16 : Mécanismes et conséquences de l'hémolyse (53)

Hémolyse intravasculaire

Les cycles répétés de falciformation vont fragiliser les GRs jusqu'à entraîner la rupture de la membrane cellulaire en cas de stress mécanique trop important. Les GRs falciformés de manière irréversible sont les plus susceptibles de se lyser (45). L'hémoglobine libre peut être prise en charge par l'haptoglobine pour être endocytée par les monocytes et macrophages.

L'haptoglobine est une protéine synthétisée par le foie. Son rôle est de former le complexe hémoglobine-haptoglobine avec l'hémoglobine libérée lors de l'hémolyse pour être éliminée du plasma par le système réticulo-endothélial, principalement au niveau de la rate. Ainsi le taux d'haptoglobine plasmatique libre diminue fortement en cas d'hémolyse sanguine et son effondrement est un critère pour affirmer le caractère hémolytique d'une anémie. La valeur normale est entre 0,5 et 2,2 g/L.

Lorsque l'haptoglobine est saturée, l'hème est libéré de l'hémoglobine et se complexe à l'hémopexine. Ce complexe est pris en charge par les macrophages et les hépatocytes via l'hème oxygénase (53).

L'hémopexine est une glycoprotéine sanguine dont le rôle est de se lier aux molécules d'hèmes issues de la dégradation de l'hémoglobine. Elle est synthétisée principalement par le foie. Le complexe hémopexine-hème est transporté jusqu'au foie pour être dégradé.

Lorsque l'hémopexine est saturée, l'hème exerce ses effets délétères sur les cellules environnantes.

Les patients drépanocytaires ont un taux d'haptoglobine et d'hémopexine réduit. L'hémopexine est d'avantage corrélée aux autres marqueurs d'hémolyse (LDH (lactate deshydrogenase), bilirubine) (54). La supplémentation en haptoglobine ou hémoglobine d'un modèle murin hyperhémolytique a permis de réduire la stase microvasculaire via l'activation de l'hème oxygénase-1 (55) .

2.3 Stress oxydant

La drépanocytose est caractérisée par un haut niveau de stress oxydant, jouant un rôle important dans la physiopathologie de la dysfonction microvasculaire, les vaso occlusions et le développement des lésions d'organe (56). Le stress oxydant correspond au résultat de la balance oxydant/antioxydant. L'augmentation de la production d'oxydant et/ou la diminution des antioxydants favorise les réactions oxydatives des lipides, protéines et de l'ADN des cellules nucléées entraînant une mort cellulaire prématurée. Chez les patients drépanocytaires, différents mécanismes contribuent au stress oxydant élevé, comme l'augmentation de l'auto-oxydation de l'HbS, l'hémolyse intravasculaire, les lésions d'ischémie-reperfusion et l'inflammation chronique (56).

Sources des EROs

En présence d'oxygène, l'HbS a une tendance augmentée à s'auto-oxyder (par rapport à l'Hb normale), entraînant la formation de méthémoglobine HbFe^{3+} (hémoglobine dont le fer a été oxydé et est passé de la forme ferreux (Fe^{2+}) à la forme ferrique (Fe^{3+}) et n'est, de ce fait, plus capable de lier l'oxygène). Cette auto oxydation entraîne la formation de radicaux libres dans les GRs, libérés en cas d'hémolyse (57) comme l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), un métabolite hautement réactif entraînant des dommages oxydants directement sur les structures intracellulaires réduisant la déformabilité du GR et promouvant sa fragilité et donc l'hémolyse (58). L'anion superoxyde dismute en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 ,) par la superoxyde dismutase, une source potentielle d'autres réactions oxydatives. La réaction de H_2O_2 avec le fer produit le radical hydroxyl libre (HO^{\bullet}) par la réaction de Fenton. Ce radical entraîne la peroxydation lipidique des acides gras de la membrane des GRs, entraînant des dommages structuraux et favorisant l'hémolyse (59) (Figure 17).

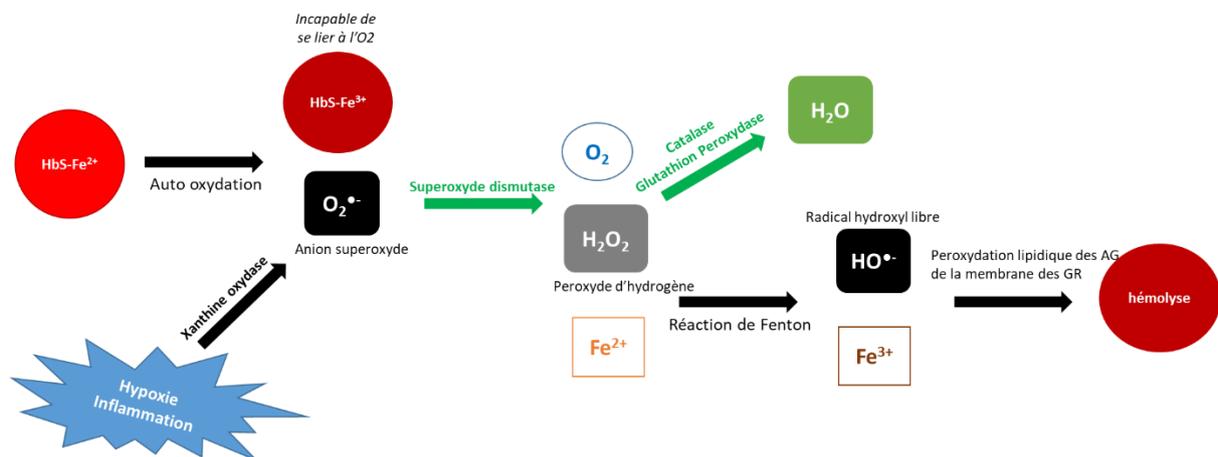


Figure 17 : Différentes étapes de production des ERO. En noir, étapes pro oxydantes. En vert, étapes anti-oxydantes. $\text{O}_2^{\bullet-}$, anion superoxyde, H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène, HO^{\bullet} , radical hydroxyl libre. (généré sur powerpoint)

L'hème libéré par l'hémolyse, du fait de sa nature hydrophobe, peut s'insérer dans la membrane des cellules endothéliales, entraînant leur activation, la production d'EROs et augmentant l'inflammation (56). De grandes quantités d'EROs sont libérées dans la circulation après chaque épisode d'ischémie-reperfusion. L'hypoxie générée par la vaso occlusion et l'ischémie déclenche une hyper production d'hypoxanthine et xanthine oxydase à partir d'adénosine triphosphate (ATP) et xanthine déshydrogénase. A la reperfusion, la xanthine oxydase va jusqu'à l'endothélium et augmente la production d'EROs et la réduction du NO (60).

Les EROs sont également générés à l'intérieur du GR par la nicotinamide-adenine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase et la xanthine oxydase endothéliale. La NADPH oxydase contribue à la

formation du radical anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) (58). La xanthine oxydase est une enzyme présente à haute concentration dans les cellules endothéliales. Pendant l'inflammation, l'oxydation d'acides aminés critiques peut entraîner la formation d' $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 à la surface de l'endothélium (58).

Les EROs sont élevés de façon systémique et au niveau intra érythrocytaire chez les patients SS (61). Les EROs endommagent les GRs en diminuant la déformabilité et en augmentant la force des agrégats (62). Ce phénomène est d'avantage prononcé chez les patients SS que chez les individus sains (AA), suggérant une susceptibilité plus importante au stress oxydant des GRs SS par rapport aux GRs AA (63).

Anti-oxydants

L'organisme possède des systèmes de défense pour lutter contre les excès d'EROs. Un anti oxydant est défini comme toute substance qui retarde, prévient ou supprime les dommages d'une molécule cible pouvant subir une oxydation. Il existe des systèmes de défense enzymatiques et non enzymatiques.

Les principaux anti oxydants non enzymatiques incluent la vitamine C, la vitamine E, le glutathion et le zinc (64). La superoxyde dismutase, catalysant la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, est la source principale de défense anti oxydante (65). Ensuite, la catalase et la glutathion peroxydase catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau (66,67). Enfin, l'hème oxygénase réduit le stress oxydant en dégradant l'hème, libérant biliverdine et bilirubine ayant également des actions anti oxydantes (68).

Chez le patient drépanocytaire, l'activité plasmatique anti oxydante est plus élevée pour la glutathion peroxydase et la superoxyde dismutase (69). A l'inverse, les patients drépanocytaires ont des niveaux abaissés de vitamine A, E, C et zinc (70).

2.4 Activation de l'endothélium (Figure 19)

L'hémolyse active l'endothélium par différentes voies. Le stress oxydant entraîne l'activation de l'endothélium favorisant l'adhésion des GRs et leucocytes à l'endothélium et augmentant le risque de vaso occlusion (71). L'activation de l'endothélium va diminuer sa synthèse de NO, alors qu'il est déjà déficitaire du fait de l'hémolyse, ce qui va renforcer l'activation de l'endothélium (72).

Les GRs falciformés activent l'endothélium par l'exposition à la surface des GRs de PS (73) et par le relargage de MPs après plusieurs cycles de falciformation/défalciformation (74). Ces MPs libèrent d'avantage d'hème (75), stimulent l'expression des molécules d'adhésion (76) et cytokines pro inflammatoires et activent la coagulation, d'une part en exposant le facteur tissulaire (77) et d'autre part en facilitant l'assemblage du complexe prothrombinase (78,79).

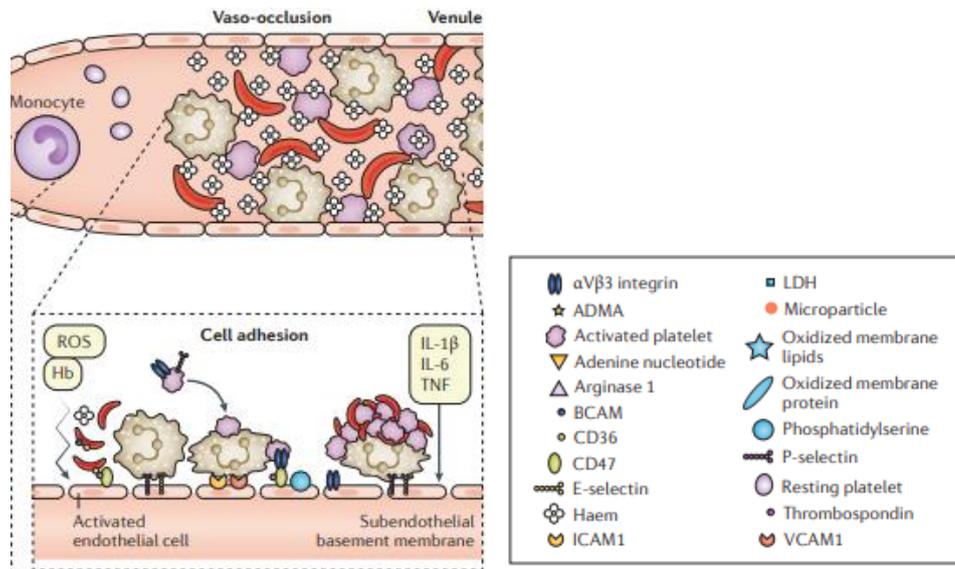


Figure 18 : Activation endothéliale dans la vaso-occlusion (33)

En réponse, les cellules endothéliales expriment de nombreuses molécules d'adhérences à leur surface : VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), ICAM-1 (*inter cellular adhesion molecule 1*), P-sélectine, E-sélectine et l'antigène leucocytaire de surface CD47 vont promouvoir l'adhérence des GRs mais également des plaquettes et leucocytes à l'endothélium (80). L'intégrine $\alpha 4\beta 1$ est une molécule très adhésive permettant la connexion des GRs à VCAM-1 (Figure 19). Le GR peut également s'accrocher via la molécule d'adhésion lutheran/BCAM (*basal cell adhesion molecule*), se fixant directement à la lamine $\alpha 5$ sur les cellules endothéliales (81).

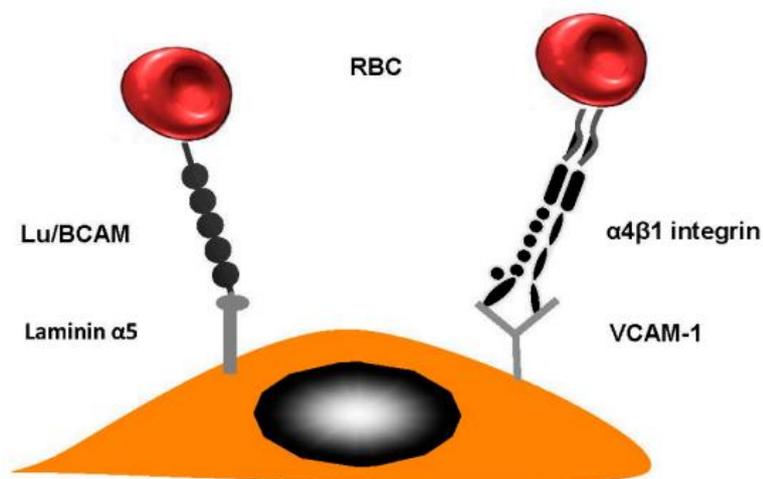


Figure 19 : Adhésion des GRs dans la drépanocytose (81)

La thrombospondine médie également l'adhérence des GRs CD36+ à l'endothélium (82). De plus, les cellules endothéliales vont produire des molécules pro-inflammatoires comme IL-1 β , IL-6 et TNF- α

(*tumor necrosis factor alpha*). Cet état inflammatoire chronique va amplifier l'expression des molécules d'adhérences (83).

Le facteur von Willebrand (vWF) favorise l'interaction entre les GRs et l'endothélium par sa taille importante. Une déplétion *in vitro* en vWF diminue la falciformation (84).

2.5 Activation de la coagulation

Il existe une activation chronique de la coagulation chez le patient drépanocytaire, y compris en dehors des crises vaso occlusives (CVO). Cette activation est suggérée par l'augmentation plasmatique du complexe thrombine-antithrombine, du fragment 1,2 de la prothrombine, du fibrinopeptide A, des D Dimères et des complexes plasmine-anti plasmine (85). L'analyse *in vitro* de la coagulation montre des résultats conflictuels pour la génération de thrombine ; une étude a montré une hypercoagulabilité en thromboélastographie chez des enfants (86).

Facteur tissulaire

Chez les patients drépanocytaires, il a été observé une augmentation du facteur tissulaire (FT) dans sa forme circulante mais également par exposition du sous endothélium. De nombreuses études ont montré une corrélation entre l'activité du FT sanguin et les marqueurs plasmatique de génération de thrombine et fibrine et le niveau d'hémolyse (85). L'hème entrainerait l'expression de FT par les cellules endothéliales (73) et les leucocytes (87). A l'inverse, augmenter la quantité de NO réduit l'expression du FT chez la souris (88).

Activation plaquettaire

Les patients drépanocytaires ont une augmentation de leur activation plaquettaire, y compris à l'état de base. Elles s'activent encore plus fortement en cas de CVO ; ceci est démontré par 1) l'augmentation des marqueurs d'activation plaquettaires solubles (*platelet derived soluble CD40 ligand, platelet factor 3, platelet factor 4, beta thromboglobulin, thrombospondin-1*), 2) la diminution de ces marqueurs à l'intérieur des plaquettes, 3) l'expression de marqueurs d'activation à la surface (p-selectine, CD63, *activated glycoprotein IIb/IIIa* et phosphatidylserine), 4) l'augmentation des agrégats plaquette-plaquette, plaquette-GR et plaquette-leucocyte et 5) l'augmentation de microparticules dérivées des plaquettes (85). Il a été suggéré le rôle de l'auto splénectomie qui entrainerait la circulation de plaquettes jeunes et hyperactives (89). L'activation plaquettaire a été corrélée au nombre de CVO dans l'année suivante (90) et aux marqueurs d'hémolyse (91). Dans le même sens, il a été montré que l'administration d'inhibiteur de la phosphodiesterase 5 (potentialisateur du signal NO dépendant) diminuait l'activation plaquettaire.

Microparticules

A l'état basal, les patients drépanocytaires ont un taux de MPs circulantes plus élevé du fait d'un état d'hyper activation chronique. Les MPs les plus impliquées seraient d'origine plaquettaire et érythrocytaire (85).

Ce sont des vésicules extracellulaires parmi lesquelles on distingue les exosomes, les vésicules et corps apoptotiques et les MPs. Ces vésicules extracellulaires diffèrent selon leur mode de production, leur taille, leur composition et leur origine cellulaire (92). Les exosomes (40-100 nm) sont les plus petites vésicules extracellulaires ; elles sont émises à partir du système endosomal. Les corps apoptotiques (1-4 μm) sont les plus grosses vésicules ; elles sont produites lors de la déstructuration de la cellule (apoptose). Les MPs (100-1000 nm) sont émises par bourgeonnement membranaire à la suite de l'activation cellulaire (Figure 20).

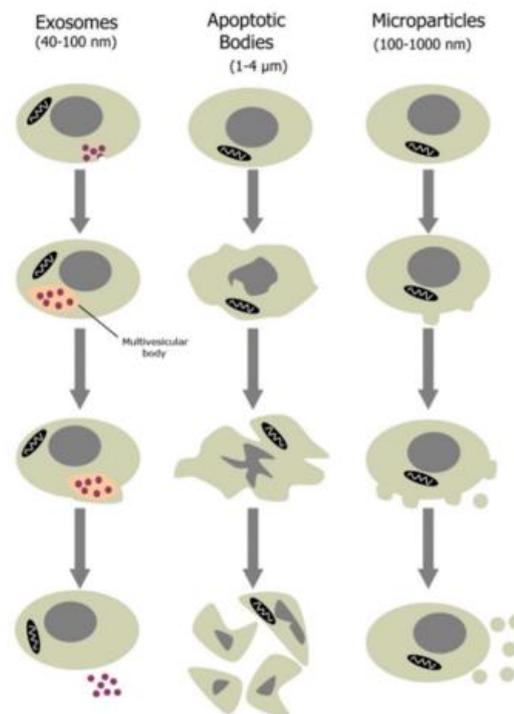


Figure 20 : Les vésicules extra-cellulaires (93)

Ces microparticules sont un terrain d'assemblage du complexe prothrombinase (85).

Protéines anticoagulantes naturelles

Une diminution modérée des protéines C et S est souvent observée à l'état basal. Ceci peut s'expliquer par la « capture » de la protéine S fixée à la surface des microparticules de GR et des GR falciformés de manière irréversible (94). D'autres explications seraient une consommation chronique liée à l'activation continue de la coagulation ou une diminution de la production du fait d'une dysfonction hépatique (95).

2.6 Inflammation et immunité

Les GRs falciformés adhèrent aux neutrophiles, entraînant leur activation, une augmentation de la production d'EROs et de l'inflammation (96). Après avoir adhéré à l'endothélium, les neutrophiles interagissent avec les GRs falciformés, jouant un rôle dans le phénomène vaso occlusif. Les molécules d'adhésion P- et E-sélectine permettent le rolling des neutrophiles sur l'endothélium (97). Le rôle de la L-sélectine est moins clair dans la drépanocytose (98). Les neutrophiles des patients drépanocytaires ont également une adhésion accrue à la fibronectine, ICAM-1 et l'endothélium (99).

L'inflammation est également secondaire à l'hémolyse libérant l'hème et l'hémoglobine qui agissent comme des DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*). Ils activent l'inflammasome via les récepteurs TLR2 (*Toll Like Receptor*) et TLR4 des monocytes et macrophages (100). Les inflammasomes sont un groupe de complexes multi protéiques intracellulaires qui s'assemblent en réponse aux DAMPs et activent des caspases pro-inflammatoires (101). La caspase 1 clive les précurseurs de l'IL-18 et de l'IL-1 β . Ces cytokines augmentent l'adhérence des cellules circulantes sur l'endothélium en activant les cellules endothéliales (102). L'hème active également les neutrophiles qui libèrent des NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*), favorisant les phénomènes thrombotiques et ayant un effet délétère sur l'endothélium vasculaire (103). Les NETs correspondent à de l'ADN extracellulaire, des histones et des granules de protéines cytoplasmiques (104).

Les patients drépanocytaires ont une augmentation de la concentration plasmatique en cytokines pro inflammatoires par rapport aux individus sains (105). Le TNF- α et l'IL-1 β activent la voie NF- κ B qui régule la production d'IL-4, IL-6, IL-8, ICAM-1, VCAM-1, P et E-sélectine (106). L'activation de la voie NF- κ B conduit à l'expression de NLRP3, menant à des dysfonctionnement endothéliaux (106). La production d'IL-6 et IL-8 est majorée lors des CVOs (107).

2.7 Tonus vasculaire

Système nerveux autonome

Chez les patients drépanocytaires, en analysant l'électrocardiogramme sur 24 heures, il a été montré que le tonus sympathique était augmenté et le tonus parasympathique diminué, d'autant plus chez les patients avec de fréquentes CVO (108), ce qui serait responsable d'un état vasoconstricte de base. Également, l'exposition de patients drépanocytaires à des épisodes d'hypoxie intermittente augmentait leur tonus sympathique (109), pouvant mimer ce qu'il se passe lors d'un épisode hypoxique déclenchant une crise vaso occlusive. Il a également été montré que l'importance du déséquilibre sympatho-vagal est associée à la durée d'hospitalisation pour la CVO (110), reflet de la sévérité de la CVO .

Endothéline-1 (ET-1)

Il s'agit de l'un des plus puissants vasoconstricteurs de l'organisme par action autocrine et paracrine. L'ET-1 est libérée de manière continue et régulée, entraînant une vasoconstriction par les récepteurs ET_A (et ET_B en moindre mesure) de la cellule musculaire lisse (111). Sa sécrétion est stimulée par l'inflammation, l'hémolyse et l'hypoxie (112,113). Les concentrations d'ET-1 circulantes sont augmentées chez le patient drépanocytaire, autant à l'état stable que pendant les CVOs (114,115). Elle interagit également avec ET_B pour relarguer du NO conduisant à une vasodilatation.

Par ailleurs, il a également été démontré que l'ET-1 a un rôle dans l'activation du canal Gardos, impliqué dans la déshydratation cellulaire augmentant la densité des GRs (116).

2.8 Biodisponibilité du NO

Un paragraphe est dédié au NO (chapitre 4 – partie IV.2.1)

Dans la drépanocytose, les composés libérés par l'hémolyse diminuent la biodisponibilité du NO (Figure 21). L'hémoglobine libre réagit avec le NO circulant pour former la méthémoglobine et du nitrate (117). L'hémoglobine libre est 1000 fois plus sensible au NO que l'hémoglobine intra érythrocytaire. Cela entraîne la diminution voire l'absence de vasodilatation en cas d'administration d'un donneur de NO (118). Quant au fer, il entraîne la formation d'EROs qui réagissent avec le NO pour former le peroxy-nitrite, une espèce réactive de l'azote.

En parallèle, l'arginase forme de l'ornithine avec la L-arginine, le précurseur du NO (119). Le taux d'arginase est élevé chez les patients avec un haut niveau d'hémolyse car l'arginase est particulièrement abondante dans les GRs jeunes, prédominant chez les patients hémolytiques du fait du turn over important. L'enzyme est libérée dans le plasma lorsque le GR jeune est lysé (120). Lors des CVOs et STAs, la L-arginine est particulièrement déplétée (121).

L'ADMA (diméthylarginine asymétrique) est un inhibiteur de la eNOS. Son taux est plus élevé chez les patients drépanocytaires. L'ensemble (déplétion en L-arginine, ADMA et stress oxydant) entraînent le découplage de la eNOS aboutissant à la formation d'EROs (122,123).

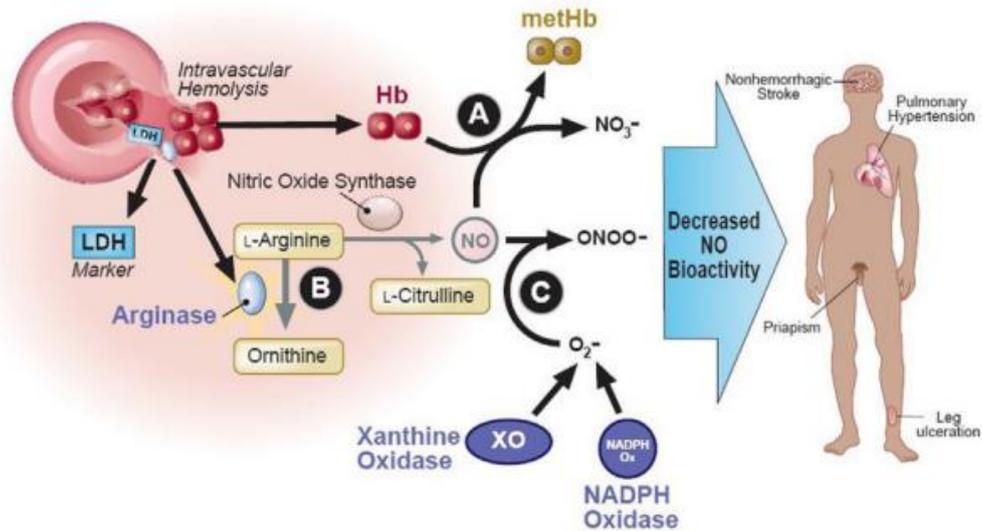


Figure 21 : L'hémolyse intravasculaire réduit la biodisponibilité du NO (102) par destruction de son substrat, la L-arginine, piégeage par l'hémoglobine libre, et formations de dérivés nitrés oxydés (nitrates NO_3^- et peroxynitrites ONOO^-)

Tous ces mécanismes participent à la dysfonction vasculaire par la diminution de la biodisponibilité du NO. La baisse du NO entraîne également une altération de l'adaptation vasomotrice, une augmentation de l'agrégation plaquettaire et de l'adhérence vasculaire (124).

Enfin, en condition désoxygénée, l'HbF a une activité nitrite réductase accrue par rapport à l'HbS (125). Pour les patients avec un taux élevé en HbF, cela favorise la production de NO en consommant les nitrites (126).

2.9 Profil hémorhéologique à l'état de base

Du fait de l'anémie hémolytique chronique, les patients SS ont un hémocrite abaissé : autour de 25% chez le patient drépanocytaire SS contre environ 40-45% chez le sujet sain (127). Cela mène à une viscosité plus basse en condition oxygénée par rapport à des individus sains (127).

A hémocrite physiologique, standardisé à 40 %, la viscosité sanguine des patients SS en condition oxygénée devient supérieure à celle des individus sains, du fait de la présence des GRs rigides irréversiblement falciformés (128). En condition désoxygénée, la viscosité devient encore plus élevée, du fait de la falciformation des GRs (128). En ce qui concerne la viscosité plasmatique, elle est également plus importante chez les patients SS, du fait de la présence de macromolécules inflammatoires, y compris à l'état basal (129).

La déformabilité des GRs est variable d'un patient à l'autre et dans le temps pour un même patient (130). Les nouveaux nés ont habituellement une déformabilité normale du fait de la présence de l'HbF.

Le remplacement progressif de l'HbS par l'HbF diminue la déformabilité. Il a été montré que les patients sans HU avec déformabilité élevée sont les patients les plus à risque de CVOs et ostéonécrose (131,132). La déformabilité s'altère d'avantage pendant les CVOs (133).

L'agrégation des GRs est également altérée. Les GRs des patients SS s'agrègent moins du fait de la présence de GRs irréversiblement falciformés qui exposent moins de surface disponible pour créer un contact cellule/cellule (134). Mais une fois formés, les agrégats sont 2 à 3 fois plus robustes que ceux de la population saine (127).

V. Complications cliniques

L'expression clinique de la drépanocytose est très variable d'un patient à l'autre et au cours du temps pour un même patient. La drépanocytose touche la majorité des organes. L'espérance de vie dépend du lieu de prise en charge : 33 ans en Afrique (135) contre 67 ans dans les pays occidentaux (136).

1. Différents phénotypes

Kato *et al.* ont développé l'hypothèse de l'existence de 2 phénotypes cliniques différents en lien avec 2 phénotypes biologiques et mécanismes physiopathologiques différents (137). Un patient peut, au cours du temps, présenter ces 2 phénotypes (Figure 22).

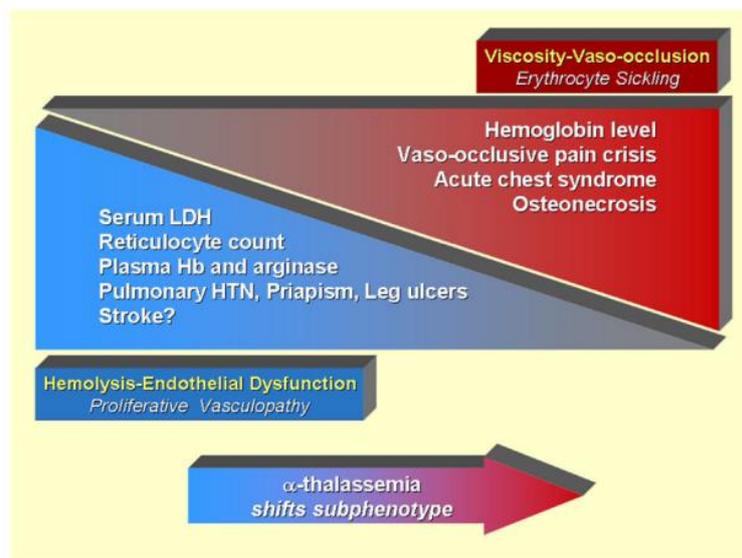


Figure 22: Chevauchement des 2 phénotypes (137)

1.1 Phénotype hémolytique

Il est associé à l'hémolyse chronique et une diminution de la biodisponibilité du NO responsables d'une dysfonction endothéliale au niveau des artérioles pré capillaires mais aussi des gros vaisseaux entraînant hypertension pulmonaire, priapisme, ulcères de jambe ou vasculopathie cérébrale (137).

Le taux d'hématocrite est plus bas que chez les patients du phénotype vaso occlusif (22-24 % contre 24-26%) (138). Différents paramètres d'hémolyse peuvent être dosés : la concentration en réticulocytes témoignant de la nécessaire régénération des GR, les LDH et l'hémoglobine libre, libérés par les GRs hémolysés. La dégradation de l'hème consécutive à l'hémolyse mène à la production de bilirubine libre, qui est ensuite conjuguée par le foie. L'hémolyse est accompagnée d'une augmentation de la concentration des ASAT (aspartate amino transférase) et ALAT (alanine aminotransférase), enzymes hépatiques et cardiaques (139). Le profil hémorhéologique du phénotype hémolytique est caractérisé par une déformabilité érythrocytaire basse et une force des agrégats plus importante (140).

1.2 Phénotype visqueux vaso occlusif

Les patients avec phénotype visqueux ont un hématocrite plus élevé ainsi qu'une viscosité plus importante. La viscosité élevée, associée aux phénomènes d'adhérence des cellules à l'endothélium et autres cellules, provoque un ralentissement du flux sanguin post capillaire. Ceci entraîne l'augmentation du temps de transit des GRs en territoire désoxygéné et laisse donc le temps à l'HbS de polymériser puis aux GRs falciformés de s'accumuler dans ces vaisseaux. L'augmentation de la déformabilité de GRs favoriserait les occlusions vasculaires avec CVOs, STAs ou ostéonécrose (131,132). Ceci s'explique par le fait que les GRs les plus déformables sont également les plus adhérents à l'endothélium vasculaire (141), ce qui diminue la lumière micro vasculaire , ralentie le flux et fait le lit de l'occlusion vasculaire (4).

2. Complications du phénotype hémolytique (figure 23)

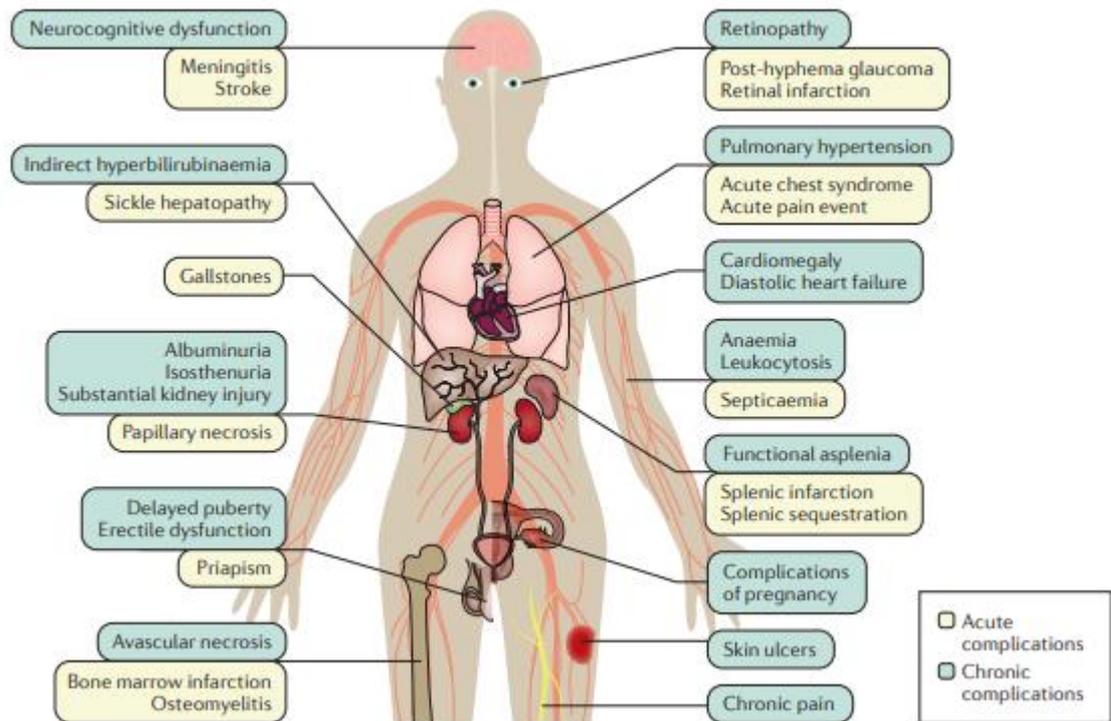


Figure 23 : Les complications cliniques de la drépanocytose (33)

2.1 Ulcères de jambe

Le prochain chapitre sera consacré de manière détaillée aux ulcères de jambe.

2.2 Anémie

L'hémolyse chronique est responsable d'une anémie chronique. L'hématocrite moyen est de 20-25% avec une hémoglobine moyenne de 7-9 g/dL. L'anémie chronique peut être aggravée par des épisodes d'hyper hémolyse en lien avec des CVOs détruisant les GRs falciformés de manière irréversible (43) ou en lien avec des phénomènes infectieux, comme une crise aplasique en réaction au parvovirus B19.

2.3 Hypertension pulmonaire

L'hypertension pulmonaire entraîne une altération des échanges gazeux. Il s'agit d'une complication grave altérant le pronostic vital (142).

Le dépistage est assuré par échographie cardiaque : la probabilité d'hypertension pulmonaire est évaluée en fonction de la vitesse de l'insuffisance tricuspide et d'autres signes échographiques comme une dilatation du ventricule droit et de l'artère pulmonaire et de la veine cave inférieure. Le diagnostic est fait par cathétérisme cardiaque droit. Les dernières recommandations de la société européenne

de cardiologie retiennent comme critère diagnostic : Pression Artérielle Pulmonaire moyenne > 20 mmHg et résistance vasculaire pulmonaire > 2 Unités Wood (143).

L'hypertension pulmonaire associée à la drépanocytose est classée dans le groupe 5 correspondant aux mécanismes non clairs ;deux mécanismes sont associés : une obstruction vasculaire d'allure thrombotique et un épaissement cellulaire des parois vasculaires (143). Alors qu'un traitement par vasodilatateur est utilisé dans d'autres étiologies d'hypertension pulmonaire, les transfusions sanguines et l'hydroxyurée sont nécessaires en cas de drépanocytose.

2.4 Autres complications pulmonaires chroniques

Les complications pulmonaires chroniques incluent également l'apnée du sommeil, l'asthme et les pneumopathies interstitielles. L'atteinte interstitielle se situe principalement dans les bases et serait secondaire aux épisodes répétés de STAs (144). Des cas de pneumopathie kystiques ont également été décrits (145).



Figure 24 : Scanner thoracique montrant une distribution homogène et diffuse de lésions kystiques associées à du verre dépoli diffus (145)

2.5 Priapisme

Le priapisme désigne une érection douloureuse anormalement prolongée, en dehors de toute stimulation sexuelle. Chez le patient drépanocytaire, le priapisme résulte d'une congestion des corps caverneux par les GRs falciformés. Le retour veineux est bloqué ; le sang ne peut être évacué du pénis. La voie du NO est atteinte, à la fois, du fait du stress oxydant inactivant le NO mais également, du fait, d'un déficit en testostérone diminuant la synthèse de NO par la eNOS. (146)

Plus de 35% des patients de sexe masculin sont atteints (147).

Pour les épisodes < 4 heures, les patients sont éduqués à tenter un traitement à domicile par glace, antalgique et benzodiazépines. Pour les épisodes plus long, un avis chirurgical est pris pour discuter une aspiration du sang des corps caverneux avec injection d'adrénaline (148). En l'absence de réponse, une transfusion peut être réalisée.

2.6 Vasculopathies cérébrales

Les patients peuvent souffrir d'AVC ischémiques ou hémorragiques. Ils peuvent entraîner un déficit neurologique d'intensité variable.

AVC ischémiques

Il s'agit d'une oblitération artérielle aigue à l'étage intra cérébral. Les AVC silencieux sont associés à la rigidité des GRs (149). L'adhésion anormale des GRs falciformés et des leucocytes à la paroi vasculaire entraîne inflammation, anémie hémolytique et diminution de la biodisponibilité du NO (150).

Les données épidémiologiques sont anciennes et on peut espérer qu'elles s'améliorent avec l'utilisation systématique de l'HU. Il avait été décrit que les pics de survenue des AVC ischémiques silencieux sont à l'âge de 5 ans puis à partir de l'âge de 30 ans (151), touchant jusqu'à 40% des enfants drépanocytaires avant la majorité (152). Dans une étude récente, dont 80% des patients étaient traités (hydroxyurée et/ou transfusion), 45% des patients, d'âge moyen de 24 ans, avaient des séquelles d'AVC ischémique à l'inclusion. Après 2 ans de suivi, environ 18 % des patients avaient un nouvel infarctus cérébral. La progression des lésions ischémiques était associée à la présence d'une hypertension artérielle (OR 3,23) (153).

Un remodelage vasculaire appelé Moya Moya peut se développer pendant l'enfance. Il résulte de l'occlusion de gros vaisseaux cérébraux et entraînent la formation d'un réseau collatéral mince et diffus semblable à un nuage de fumée (Moyamoya en japonais) (154).

Des mesures régulières du flux sanguin cérébral sont réalisées par écho doppler transcranien afin de détecter une vasculopathie cérébrale et prévenir un AVC. L'étude STOP montraient une augmentation du risque d'AVC en vitesse moyenne > 200 cm/sec. En cas de vitesses élevées, un programme transfusionnel peut être mis en place pour réduire l'HbS < 30 % et diminuer le risque d'AVC de 11 à 1% (155). Il n'existe pas d'abaque pour les patients adultes.

AVC hémorragiques

Il s'agit d'un saignement intracrânien. Les AVC hémorragiques surviennent principalement chez l'adulte, avec un pic de 20 à 30 ans (151), s'expliquant par le fait que le risque d'AVC hémorragique provient du risque de saignement des petites artères du Moya Moya.

2.7 Complications cardiaques

Le cœur est protégé de la falciformation, car il contient le sang le plus riche en oxygène. Pourtant les complications cardiaques sont l'une des causes principales de morbidité et mortalité chez les patients

drépanocytaires ; l'incidence augmentant avec l'âge. Un tiers des décès des patients drépanocytaires serait lié à une atteinte cardiaque (principalement mort subite et arythmie) (156).

L'anémie chronique augmente le risque d'événement cardio vasculaire en entraînant une augmentation du débit cardiaque. Cela nécessite des modifications morphologiques qui finiront par être non adaptées. Les complications cardiaques rapportées sont les dysfonctions diastoliques, les troubles du rythme, les insuffisances cardiaques, les hypertrophies myocardiques et plus rarement, les infarctus du myocarde (157). Les mécanismes identifiés sont schématisés dans la Figure 25.

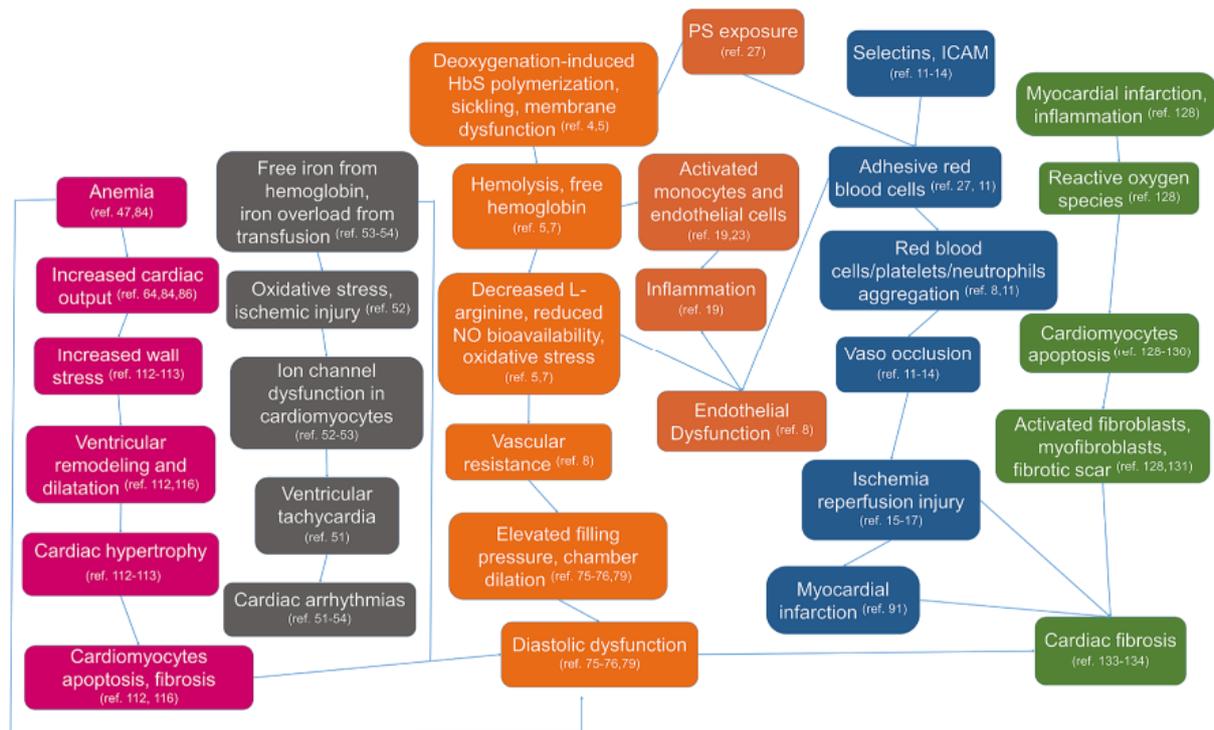


Figure 25 : Physiopathologie des pathologies cardiaques dans la drépanocytose (158)

2.8 Complications rénales

La médulla favorise la falciformation des GRs car la pression partielle en oxygène est très faible (35-40 mmHg) et l'osmolalité favorise la déshydratation des GRs, augmentant la concentration en HbS. Ces complications peuvent être directement secondaire à l'hémolyse ou résulter d'occlusions vasculaires rénales entraînant une ischémie corticale. Cela est compensé par une augmentation du flux sanguin qui va augmenter le débit de filtration glomérulaire et conduire à une sclérose glomérulaire (159).

Un patient sur 3 développe des complications rénales sous la forme d'une hématurie, d'une albuminurie voire d'une protéinurie et/ou d'une insuffisance rénale aiguë ou chronique au stade d'insuffisance rénale terminale dans 18 % des cas (160).

3. Complications du phénotype vaso-occlusif

3.1 Crises vaso occlusives (CVO)

Elles sont définies par une douleur > 4 heures sans autre étiologie évidente (161). Il s'agit de la 1^{ère} cause d'hospitalisation des patients drépanocytaires. Des douleurs intenses surviennent, pouvant nécessiter l'usage d'opioïdes.

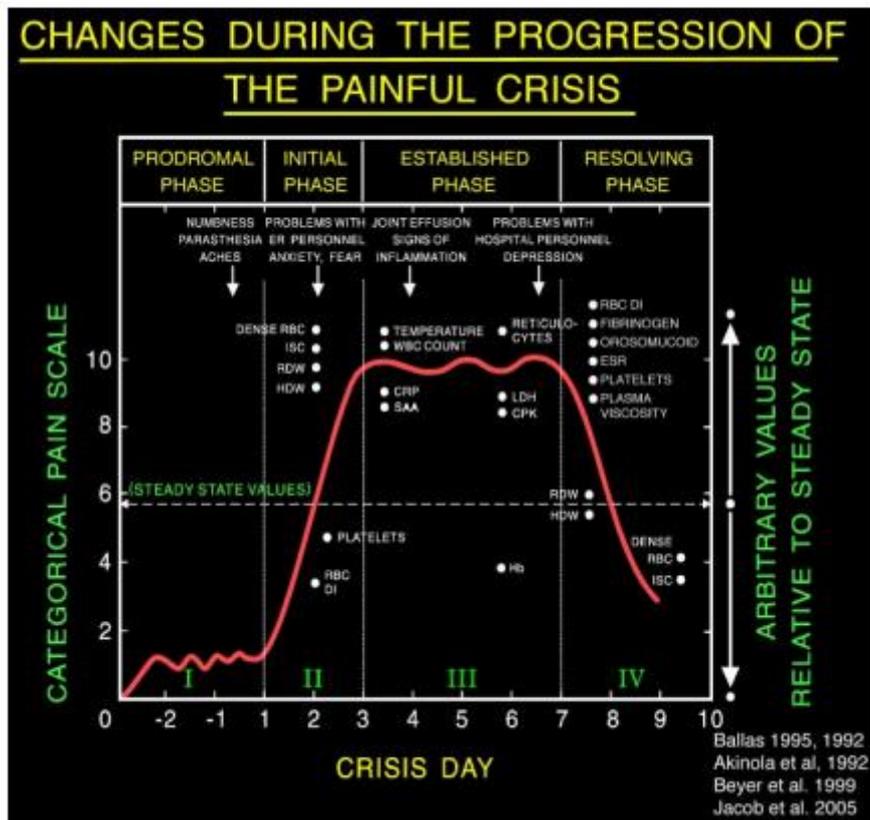


Figure 26 : Profil clinique et biologique typique au cours d'une crise vaso occlusive en l'absence d'infection ou autre complication (162). La crise peut être soudaine ou évoluer en 4 phases (163):

1/ La phase prodromale dure environ 2 jours. Le patient ressent des paresthésies et des courbatures au futur site de la douleur. Les GRs ont une déformabilité abaissée et une densité augmentée du fait de la falciformation et de la déshydratation des GRs (164).

2/ La phase initiale marque le début des douleurs avec un pic au 2^e jour pouvant déclencher peur et anxiété. Le pourcentage de GRs irréversiblement falciformés a augmenté.

3/ La phase établie correspond à une forte douleur pendant 4 jours du fait de l'augmentation des phénomènes inflammatoires : augmentation de la température, des globules blancs, de la protéine C réactive, des réticulocytes et des LDH et baisse de l'hémoglobine en lien avec l'hémolyse importante. La déformabilité des GRs est généralement plus élevée que durant les deux phases précédentes car 1) les GRs les plus rigides étant bloqués dans la microcirculation ne sont pas présents dans les échantillons de sang prélevés et 2) les GRs les plus rigides sont aussi les plus fragiles et sont lysés (165). L'agrégation des GRS ainsi que la force des agrégats augmentent.

4/ La résolution voit les douleurs diminuer pendant 2 à 3 jours. Le pourcentage de GRs irréversiblement falciformés diminue. Le fibrinogène, les plaquettes et la viscosité augmentent. Il a été montré que plus

la déformabilité est élevée lors de cette phase, plus le risque de refaire une CVO est élevé, probablement du fait de l'augmentation de l'adhérence vasculaire des GRs plus déformables qui vont alors limiter le flux sanguin et initier les conditions hémodynamiques favorables à une nouvelle CVO (164).

Les douleurs peuvent cibler un territoire vasculaire, des muscles profonds, le périoste ou la moelle osseuse (163). Les fibres nociceptives, nombreuses dans ces tissus, sont activées par l'inflammation.

Ces épisodes surviennent dès l'enfance sous la forme de syndrome pied-main ou dactylite ; la fréquence augmente avec l'âge. Il peut en résulter des séquelles neurologiques irréversibles sous la forme d'une allodynie (162).

La plupart des CVOs n'ont pas d'élément déclencheur identifié. Toutefois, les changements brusques de température, une déshydratation, un stress psychologique, une infection ou une grossesse sont des facteurs déclencheurs connus (162). Il a également été montré que les patients avec une viscosité sanguine élevée à l'état de base étaient plus à risque de faire des CVOs fréquentes par rapport à des patients dont la viscosité sanguine est plus faible (108,132,166).

3.2 Syndrome thoracique aigu

Il s'agit de la 2^e complication la plus fréquente, potentiellement létale. La sévérité augmente avec l'âge. Les symptômes peuvent être fièvre, toux, baisse de l'hémoglobine, dyspnée ou douleur thoracique associés à un nouvel infiltrat pulmonaire radiologique (163). Elle peut suivre une crise vaso occlusive mais la physiopathologie n'est pas clairement expliquée. Elles peuvent être associées à une infection, une embolie pulmonaire crurorique ou graisseuse, un infarctus pulmonaire et/ou une occlusion de la microcirculation pulmonaire (167,168) mais l'étiologie n'est pas identifiée dans 50% des cas. Il peut entraîner une chute de la pression sanguine en oxygène qui va renforcer le phénomène de falciformation.

La prise en charge est urgente. Le traitement utilise antibiotiques à large spectre, bronchodilatateurs, corticothérapie, oxygénothérapie et transfusion sanguine (163).

3.3 Ostéonécrose

Aussi appelée nécrose aseptique, les ostéonécroses sont dues à une obstruction vasculaire répétée au niveau osseux. Elle touche environ 30 % des patients drépanocytaires (169). Elle est secondaire aux ischémies-reperfusions répétées et va entraîner la mort des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse (170). Les cellules hématopoïétiques sont très sensibles à la faible pression en oxygène ; en cas de diminution de l'apport sanguin, elles meurent en 12 heures (171).

Il a été suggéré que le débit artériel est réduit au niveau osseux en raison d'une hyperviscosité sanguine (172). La tête fémorale et la tête humérale sont le plus souvent atteintes mais les patients ont souvent une atteinte multifocale (173). En cas de lésion osseuse trop importante, la pose de prothèse articulaire est nécessaire.

4. Autres complications

4.1 Splénomégalie et asplénie

La rate est le site de destruction des GRs (des macrophages y éliminent les GRs sénescents) et un organe lymphoïde secondaire. En cas de dysfonction splénique, le système immunitaire est altéré ce qui entraîne une susceptibilité accrue aux infections et de complications auto immunes et vasculaires.

La splénomégalie est souvent secondaire à des CVOs piégeant une grande quantité de GRs dans la rate. A l'âge de 1 an, 93% des enfants avaient une rate palpable puis 16% à l'âge de 10 ans (89). Les CVOs répétés entraînent à terme une asplénie fonctionnelle par fibrose.

4.2 Complications hépatiques

En cas de CVO dans le foie, une séquestration des GRs falciformés va entraîner obstruction vasculaire, hépatomégalie et cytolyse caractérisée par une augmentation des concentrations d'ASAT et d'ALAT en parallèle de l'augmentation des marqueurs d'hémolyse. Cette complication répond à une transfusion sanguine. Comme pour la rate, la répétition des CVOs peut aboutir à une fibrose puis une cirrhose potentiellement fatale (174).

4.3 Complications biliaires

L'hémolyse est responsable d'une augmentation de la bilirubine non conjuguée favorisant la formation de lithiases vésiculaires (175). Le risque est l'évolution vers une infection et une inflammation de la vésicule biliaire, nécessitant une chirurgie urgente. L'idéal est de prévoir une chirurgie programmée dans cette indication afin de préparer au mieux le patient pour limiter le risque de complication grave. Chez le patient drépanocytaire, il s'agit d'une chirurgie bien plus pourvoyeuse de morbidité que dans la population générale (176).

4.4 Complications oculaires

La complication oculaire la plus fréquente touche la rétine en réponse à l'ischémie micro vasculaire ; on distingue les rétinopathies prolifératives et non prolifératives. Les rétinopathies prolifératives peuvent évoluer jusqu'à la cécité du fait d'une ischémie, d'une hémorragie vitréenne ou d'un décollement de la rétine. La surveillance systématique est indispensable (177). Dans la maculopathie,

les petits vaisseaux deviennent anormalement perméables, ce qui entraîne l'accumulation de liquide dans la rétine, responsable d'une baisse progressive de la vision.

Le traitement se fait par photo coagulation pan rétinienne au laser pour prévenir les complications.

VI. Modulateurs génétiques

1. Hémoglobine fœtale

L'HbF limite la polymérisation de l'HbS en diminuant sa concentration intra érythrocytaire et en s'intercalant entre les HbS, empêchant les interactions hydrophobes en conditions désoxygénées (178). Toutefois, le taux minimal d'HbF nécessaire pour bloquer la polymérisation n'est pas connu ; la distribution de l'HbF étant variable d'une cellule à l'autre. Pour limiter la falciformation, une concentration minimale d'HbF de 10 pg est requise au sein d'un GR (179). La persistance génétique de l'HbF permet d'atteindre un taux entre 10 et 25 %, réduisant généralement la sévérité de la maladie (4,180,181). Elle résulte de l'association de polymorphismes génétiques dont notamment sur le gène BCL11A, la région inter génique HBS1L-MYB et le gène Xmn1 (182).

2. Alpha-thalassémie

Il existe 4 gènes fonctionnels codant pour l' α -globine chez les individus sains. Une alpha thalassémie se caractérise par une délétion d'un ou plusieurs gènes codant l' α -globine entraînant une diminution de sa synthèse. Trente à 40 % des patients drépanocytaires seraient porteurs d'une délétion de l' α -globine (183). Cela entraîne une diminution de la quantité d'HbS dans les GRs des patients SS alpha thalassémiques, réduisant la propension à polymériser de l'HbS et donc l'hémolyse (183,184). Également, l'alpha-thalassémie diminue le volume globulaire moyen (VGM) et le CCMH, entraînant un meilleur rapport surface/volume permettant une déformabilité des GRs plus importante (16).

L'alpha-thalassémie a été rapportée comme protectrice des ulcères de jambe (185), des glomérulopathies (184), des AVC ischémiques (186) et du priapisme (73). Toutefois, l'alpha-thalassémie serait également responsable d'une augmentation de l'adhérence des GRs à l'endothélium et une hausse de la viscosité sanguine via la diminution de l'hémolyse, ce qui favoriserait l'obstruction vasculaire et les complications de type vaso occlusives (4).

3. Déficit en G6PD

Il s'agit de l'enzymopathie la plus commune au monde. La glucose 6 phosphate déshydrogénase (G6PD) est une enzyme érythrocytaire impliquée dans le métabolisme énergétique, produisant du NADPH. Le NADPH est indispensable pour la régénération du glutathion réduit, une molécule aux propriétés anti oxydantes qui sert de substrat à la glutathion peroxydase pour éliminer les lipides hydro peroxydés et le peroxyde d'hydrogène. Ce phénomène donne au glutathion sa forme oxydée, d'où la nécessité de la NADPH pour régénérer le glutathion réduit et maintenir le potentiel anti oxydant (188).

Le déficit en G6PD aussi appelé favisme est une maladie génétique liée au chromosome X. L'activité enzymatique de la G6PD dépend du variant impliqué (189). Via la diminution de l'activité anti oxydante, le déficit en G6PD entraîne une hémolyse responsable d'une anémie.

Ce déficit est retrouvé plus fréquemment chez les patients drépanocytaires en raison d'un effet protecteur contre le paludisme (190). Le déficit en G6PD associé au contexte pro oxydant du patient drépanocytaire va renforcer le stress oxydant et augmenter le niveau d'hémolyse. Il a été montré une association, entre l'AVC ischémique qui est une complication hémolytique et la présence d'un déficit en G6PD (139,186).

3. Haplotype du gène βS

Il existe 5 haplotypes ou polymorphismes majeurs liés au gène βS : Bénin, Cameroun, Bantu ou République de Centre Afrique (CAR), Sénégal (SEN) et Arabo-Indien (ARAB). Ces 5 haplotypes correspondent aux différentes régions où sont apparues la mutation βS . La forme de la maladie dépend de cet haplotype. L'haplotype CAR est rapporté comme le plus sévère du fait d'une anémie hémolytique plus intense en lien avec un taux d'HbF bas (139,191). A l'inverse, la production d'HbF est augmentée pour les haplotypes Bénin, SEN et ARAB, entraînant une forme clinique moins sévère (192–194).

VII. Thérapeutiques

On peut considérer 3 grands types de traitements de la drépanocytose :

- Les traitements modifiants la maladie ayant pour objectif de réduire le nombre d'épisodes douloureux et les différentes complications
- Les traitements de support de la maladie et/ ou utilisés en cas de situation aigue

- Les traitements curatifs ayant pour objectif de guérir la maladie

1. Traitements modifiant la maladie

1.1 Hydroxyurée

Initialement destinée au traitement des leucémies par son action myélo suppressive, il a été mis en évidence son effet sur la fréquence CVOs et STAs avec réduction du nombre de transfusion nécessaire (195). Il s'agit maintenant du traitement de référence des patients drépanocytaires ayant fait 3 CVOs au moins et/ou un STA pendant l'année.

- Augmentation de l'HbF

L'HU stimule la production de l'HbF par les progéniteurs érythroïdes ayant conservé leur potentiel de synthèse (196). Le taux d'HbF est alors augmenté dans les GRs matures et limite le taux d'HbS (197). La synthèse d'HbF en réponse à l'HU dépend de modulateurs génétiques (139).

- Réduction de l'adhérence

En tant qu'agent cytotoxique, l'HU entraîne leucopénie et thrombopénie. La diminution de l'adhérence provient également de la diminution des réticulocytes, cellules particulièrement adhérentes, et de l'expression des molécules d'adhérence (198). Cela entraîne une réduction des interactions inter cellulaires et de l'inflammation (199).

- Donneur de NO

L'HU libérerait du NO par divers procédés métaboliques et enzymatiques dont une réaction avec la peroxydase, l'hydrolyse de l'HU en hydroxylamine et l'auto oxydation de la molécule (200).

L'HU augmente également la production de NO par les cellules endothéliales, par la phosphorylation activatrice directe de la synthase endothéliale du NO (eNOS) et par la libération d'ATP par les GRs pour activer P2YR sur les cellules endothéliales qui va également stimuler la eNOS (196).

- Amélioration de la rhéologie (Figure 27)

L'effet apparaît quelques mois après le début de la prise du médicament (201). La diminution de l'hémolyse augmente l'hématocrite et la concentration en hémoglobine. Il n'est pas noté d'augmentation de la viscosité sanguine du fait de l'augmentation de la déformabilité érythrocytaire et de la baisse de la force des agrégats des GRs (201). L'augmentation du VGM entraîne une meilleure hydratation des GRs et donc une diminution de leur viscosité interne (201).

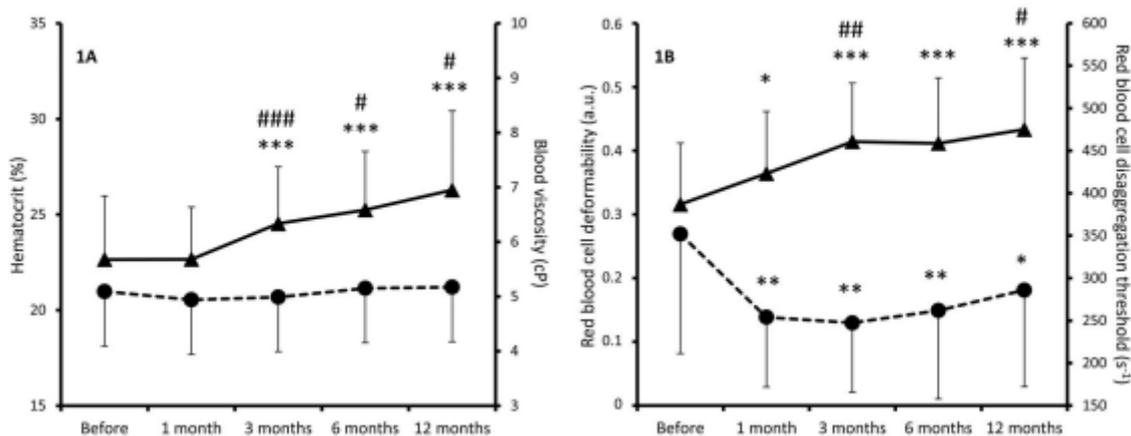


Figure 27 : Effet de l'Hydroxyurée sur l'hématocrite (ligne continue –figure A), la viscosité sanguine à 225 s⁻¹ (ligne en pointillés- figure A), la déformabilité des GRS à 30 Pa (ligne continue –figure B) et le seuil de désagrégation des GRs (ligne en pointillés –figure B). Différence après introduction de l'hydroxyurée (*P<0,05 ; **P<0,01 ; ***P<0.001) et différence par rapport aux valeurs précédentes (#P<0,05 ; ##P<0,01 ; ###P<0.001) (201)

Le profil de sécurité à long terme est rassurant (202) mais du fait d'un potentiel effet tératogène il doit être associé à une contraception chez les femmes et être suspendu chez les hommes avec projet de conception.

1.2 Voxelotor

L'objectif est d'inhiber la polymérisation de l'HbS en se fixant à l'hémoglobine pour stabiliser l'état oxygéné et *in fine* augmenter l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Le voxelotor se fixe de manière réversible à la valine N-terminale de la chaîne α (203).

L'étude de phase 3 montrait une augmentation de l'hémoglobine et une diminution des marqueurs d'hémolyse (204). Il a également été une diminution des complications comme les CVOs et l'atteinte rénale (205). D'autres études sont en cours pour vérifier qu'il n'y ait pas d'effets indésirables à long terme secondaires à l'augmentation de l'affinité de l'oxygène pour l'hémoglobine (206).

1.3 Crizanlizumab

Il s'agit d'un anticorps monoclonal dirigé contre la P sélectine, molécule d'adhérence clé. En se liant à la P sélectine, le crizanlizumab bloque son interaction avec PSGL-1 (P selectine glycoprotéine ligand 1) sur les plaquettes et les monocytes et donc l'adhérence endothéliale (207). En phase 2, une injection intraveineuse, toutes les 4 semaines, réduisait la fréquence des événements douloureux (208). En phase 3, il n'a pas été montré de différence entre le crizanlizumab et le placebo (209), ce qui a entraîné sa perte d'autorisation européenne.

1.4 L-Glutamine

L'objectif est d'augmenter la biodisponibilité du glutathion réduit pour obtenir un effet anti oxydant. En phase 3, la L-Glutamine réduisait le nombre de crises douloureuses (210). Des progrès restent à faire en ce qui concerne le choix de dose personnalisée et l'identification d'un biomarqueur qui permettrait d'évaluer la réponse au traitement (211).

1.5 Activateur de pyruvate kinase

La pyruvate kinase est une enzyme clé de la glycolyse, seule source d'ATP. L'ATP est essentielle pour les activités énergie-dépendantes du GR. Les patients drépanocytaires ont une moindre activité de la pyruvate kinase.

Activer la pyruvate kinase permettrait de traiter les anémies hémolytiques en augmentant le niveau d'ATP et en diminuant le niveau de 2,3-DPG (qui favorise la falciformation en diminuant l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène) (212) (Figure 28).



Figure 28 : Le rôle de la pyruvate kinase dans la falciformation érythrocytaire (213)

L'augmentation du contenu cellulaire en ATP améliore également l'intégrité du GR et le niveau d'hydratation cellulaire (214).

En phase 2, on observait une augmentation de l'hémoglobine et une diminution des marqueurs d'hémolyse chez 9 patients drépanocytaires après 56 jours de traitement avec un activateur de pyruvate kinase (213). L'effet était maintenu 4 semaines après l'arrêt du traitement, suggérant une amélioration de la survie des GRs.

Les études de phase 3 sont en cours.

1.6 Monoxyde d'azote (NO)

Le NO est une thérapeutique séduisante de par ses effets vasodilatateurs et anti inflammatoire. Le NO inhalé chez des patients en CVOs ou STAs n'a pas montré de bénéfice (215). Le NO semble plus prometteur sous la forme d'un topique local donneur de NO pour le traitement des ulcères de jambe (216).

2. Traitements de support

2.1 Prévention des infections

Les infections bactériennes sont une cause fréquente de décès chez les enfants drépanocytaires. L'altération de la fonction splénique ou l'asplénie entraînent un défaut de l'activation du complément et une carence en micronutriments, responsables d'une augmentation du risque d'infection (217). En conséquence, le suivi vaccinal est accru. Une antibiothérapie prophylactique peut être nécessaire. L'apparition de lithiases vésiculaires est surveillée, pour réalisation d'une cholécystectomie prophylactique. Tout épisode infectieux est susceptible de déclencher une CVO ou un STA.

2.2 Antalgiques

En cas de douleur, il est impératif que le patient drépanocytaire prenne rapidement un traitement antalgique adapté à sa douleur, sous peine que la douleur soit un facteur aggravant de l'épisode en cours. Cela peut nécessiter un recours aux antalgiques de niveau 3 (opioïdes) (161).

2.3 Transfusion sanguine et érythraphérèse

La transfusion permet de corriger une anémie sévère, en cas d'hyper hémolyse notamment. Les recommandations sont de ne pas transfuser tant que l'hémoglobine reste supérieure à 5 g/dL (218). Le risque de cibler une hémoglobine plus haute, serait d'augmenter la viscosité sanguine de manière trop importante. Toutefois, il peut être nécessaire de réaliser une transfusion à visée thérapeutique, en urgence, en cas de sepsis majeur ou accident ischémique.

L'érythraphérèse ou échange transfusionnel remplace les GRs contenant de l'HbS par des GRs sains. L'objectif est de maintenir le taux d'HbS < 30% sans dépasser 11 g/dL d'Hb (163,218). L'échange permet de maîtriser la viscosité sanguine. Ils permettent d'améliorer le flux microvasculaire par la diminution du nombre de GRs falciformés circulants, ce qui réduit les dommages endothéliaux et l'inflammation (219). Ils sont réalisés environ toutes les 8 semaines pour prévenir CVOs, STAs et AVC. Ils sont également utilisés en péri opératoire. Ils peuvent être réalisés de manière manuelle (une saignée de sang total et suivie d'une transfusion, mais ne permet pas d'ajuster précisément l'hématocrite (220))

ou automatisé (échange isovolémique permettant d'obtenir un hématicrite et une concentration en hémoglobine cible, limitant les risques d'hyperviscosité sanguine (221) et de surcharge en fer).

Les autres dangers sont le risque d'allo immunisation conduisant à la production d'allo anticorps (222) et l'hémolyse post transfusionnelle (223).

2.4 Plasmaphérèse

La plasmaphérèse ou échange plasmatique permet de diminuer les facteurs pro oxydants, pro inflammatoires et pro agrégants présents dans le plasma des patients drépanocytaires (224). Le recours à la plasmaphérèse chez des patients ne répondant pas une érythraphérèse dans le cas d'un état clinique grave permet le rétablissement de la microcirculation dans les tissus endommagés et une amélioration clinique (225). Toutefois, elle est peu utilisée car il n'existe pas d'études ayant inclus de larges groupes de patients drépanocytaires pour tester l'effet de cette approche thérapeutique.

3. Traitements curatifs

2.1 Greffe de moelle osseuse

La moelle osseuse du patient est détruite puis remplacée par des cellules souches hématopoïétiques d'un donneur sain HLA compatible. En cas de succès (dans 97% des cas (226)), les patients sont guéris et produisent des GRs sains. Cette technique est limitée par son cout et le faible nombre de donneurs HLA compatibles (227). Elle est réservée aux drépanocytoses les plus sévères.

2.2 Thérapie génique

Le gène muté β^S est remplacé par un gène normal dans les cellules souches hématopoïétique. Il existe différentes techniques pour réaliser ce remplacement :

- Recombinaison homologe insérant le gène normal au locus du gène β^S (228)
- Transfert du gène non muté dans les cellules souches hématopoïétiques par un vecteur rétroviral (229)
- Editer le génome à l'aide de la technique CRISPR-Cas9, une endonucléase associée à un ARN permettant de se lier à une séquence cible. L'endonucléase coupe la séquence mutée et la séquence correcte est insérée (230). CRISPR-Cas9 est utilisé pour retirer le gène BCL11A répresseur de la synthèse de l'HbF, permettant l'augmentation de sa synthèse dans les progéniteurs érythroïdes (231,232). Le CASGEVY a obtenu l'AMM aux Etats Unis en décembre 2023.

Ces traitements sont limités aux pays développés du fait de leur cout élevé.

4. *La place des anti agrégants plaquettaires et anticoagulants*

Pour l'instant, il n'y a pas de place pour l'anticoagulation ou l'anti agrégation plaquettaire systématique chez les patients drépanocytaires.

3.1 Anticoagulation

Une étude a randomisé 253 patients HbSS pour l'utilisation de Tinzaparine en double aveugle contre placebo. Elle a montré une réduction du nombre de jours avec le score de douleur le plus élevé, de la durée totale de CVO et de la durée d'hospitalisation (233). Il est possible que l'effet soit lié aux propriétés anti inflammatoires (234) et/ou bloqueuse de la P-selectine de la classe héparine (235).

Une étude sur 12 patients HbSS a montré une réduction modeste de la fréquence des épisodes douloureux avec la Coumadine (236).

Sur modèle murin, en exprimant une mutation réduisant de 10% le taux de prothrombine, il a été observé une réduction des marqueurs inflammatoires (Il-6, D dimères, VCAM-1 soluble) ainsi qu'une diminution de la mortalité et des lésions d'organe (poumon, rein, cœur et foie) (237). Une étude pilote a été réalisée chez 14 patients HbSS pour tester le rivaroxaban pendant 4 semaines. Il n'a pas été observé d'effet sur l'activation de la coagulation, l'activation endothéliale, l'inflammation et la microcirculation cutanée (238). La question est de savoir si 4 semaines de traitement est suffisant pour observer un effet biologique et microcirculatoire.

Une étude de phase 3 sur 16 patients pour l'apixaban 2.5 mg 2 fois par jour (soit une dose préventive) pendant 6 mois est en attente de publication (NCT02179177). Le critère principal d'évaluation était la douleur.

3.2 Anti agrégant plaquettaire

Différents anti-agrégants plaquettaires ont été testés chez les patients drépanocytaires.

La ticlopidine (inhibiteur de la liaison ADP-dépendante du fibrinogène à une membrane plaquettaire) entraînait une réduction de la fréquence, la durée et la sévérité des CVO après 6 mois de traitement, dans une étude randomisée contrôlée en double aveugle contre placebo (239). La ticlopidine n'est plus utilisée du fait de sa longue durée d'action, ce qui est dommageable en situation hémorragique.

L'éptifibatide (un inhibiteur spécifique et réversible du récepteur α IIb β 3) a été testé chez des patients admis pour une CVO dans une étude randomisée contrôlée en double aveugle contre placebo (240). Il

n'a pas amélioré la durée d'hospitalisation, la durée de résolution de la crise et la consommation de morphiniques.

Le prasugrel (3^{ème} génération d'anti P2Y12) a été testé chez 341 enfants drépanocytaires pendant 9 à 24 mois. Il n'a pas montré de différence pour la fréquence des CVO, comparé au placebo (241). Toutefois, l'effet semblait plus intéressant chez les enfants non traités par hydroxyurée.

L'espérance de vie, bien qu'en amélioration, reste inférieure à celle de la population générale (136). De nouvelles pistes thérapeutiques sont nécessaires. De plus, alors que la prévalence de la drépanocytose SS y est la plus élevée, la plupart des traitements ne sont pas disponibles dans les pays en voie de développement (242).

Chapitre 3 – Les ulcères de jambe du patient drépanocytaire

Un ulcère est une plaie qui ne cicatrise pas spontanément en 2 semaines (243). Les ulcères des membres inférieurs du patient drépanocytaire ont un retentissement psychosocial important (244). Ils sont associés à un risque plus élevé de décès précoce (245). La prévalence actuelle varie entre 1,4 % au Brésil et 29,5% en Jamaïque (246–250).

La physiopathologie des ulcères des membres inférieurs reste mal connue. L'histoire naturelle de l'apparition d'un 1^{er} ulcère de jambe chez le patient drépanocytaire est souvent reproductible. La 1^{ère} fois, il apparaît du fait d'un phénomène ischémique puis l'évolution ressemble à celle d'un ulcère veineux.

I. Phénomène ischémique initial

Plusieurs arguments sont en faveur d'une vaso occlusion locale entraînant un infarctus micro vasculaire. La majorité des ulcères de jambe des patients drépanocytaires surviennent de manière spontanée, sans traumatisme local (251). Les patients rapportent une douleur spontanée, suivie d'une induration, d'une hyperpigmentation ou d'une nécrose sous cutanée entraînant un décollement cutané et la destruction de l'épiderme (251). Chez certains patients, la plaie peut être secondaire à un petit traumatisme ou un grattage (252). Toutefois, quel que soit l'origine de l'ulcère, l'évolution est identique (251).

1. Caractéristiques générales des patients

La majorité des études rapportent une incidence plus élevée des ulcères de jambe chez les patients drépanocytaires de sexe masculin par rapport aux patients de sexe féminin (253). Le ratio homme/femme est autour de 2 aux Etats Unis et au Nigeria (254,255). Il a également été rapporté que les patients avec ulcères des membres inférieurs ont une faible condition sociale (247). Dans la cohorte jamaïcaine, 85 % des patients avec ulcères vivaient en dessous du seuil de pauvreté alors que c'est le cas de 46 % des patients drépanocytaires sans ulcère (246).

La malnutrition, caractérisée par un niveau abaissé d'albumine (256) ou un faible indice de masse corporelle (248,256), est associée à la survenue des ulcères de jambe chez les patients drépanocytaire.

La malnutrition est un dénominateur commun chez tous les patients souffrant d'une plaie chronique. Cette malnutrition peut apparaître précocement et favoriser le développement de la plaie ou apparaître pendant le phénomène de cicatrisation (257). Chez les patients drépanocytaires, la malnutrition peut également être la conséquence de leur condition sociale. L'importance de la prise en charge de la nutrition a été largement prouvée dans le traitement des plaies chroniques (258) et est donc un pilier de la prise en charge des ulcères de jambe des patients drépanocytaires.

2. Modifications vasculaires

Un apport sanguin insuffisant entraîne des modifications micro vasculaires qui retardent la cicatrisation. L'étude au microscope optique du lit de la plaie chez les patients drépanocytaires a révélé une vasculopathie (253) avec activation de l'endothélium capillaire, un aspect de thrombus/recanalisation et une néo vascularisation autour des capillaires occlus (253,259). En position jambe pendante, une vasoconstriction inappropriée a été observée autour de l'ulcère des patients drépanocytaires (260) et pourrait contribuer au retard de cicatrisation. La diminution de la déformabilité des GR pourrait également participer à la réduction de l'apport en oxygène (150). Ces changements vasculaires se développent plus ou moins vite pour chaque patient. Des ulcères sont rapportés à partir de l'âge de 10 ans (185,246,249,251).

Également un aspect de stase capillaire et veineuse a été observé au microscope optique et en laser doppler (253,261). L'abolition du réflexe veno artériolaire et la dysfonction du système nerveux autonome favorisent la stase veineuse (262). La pression induite par la stase veineuse est maximale au niveau de la région perimalléolaire, localisation préférentielle des ulcères des patients drépanocytaires (251,263). La stase peut également favoriser la formation des ulcères en entraînant une falciformation érythrocytaire locale du fait d'une longue exposition à une hypoxie (264) et donc une vaso-occlusion locale.

Des anomalies macro vasculaires ont également été observées, suggérant une vasculopathie diffuse avec notamment une augmentation de l'épaisseur intima-média de l'artère fémorale (265). A savoir que les patients drépanocytaires ont déjà une épaisseur intima média plus importante que celle des patients non drépanocytaires (265).

3. Hémolyse

Habituellement, la sévérité de l'anémie et de l'hémolyse est associée à la survenue des ulcères (134) ; les marqueurs d'hémolyse (LDH, bilirubine, ASAT, réticulocytes) sont plus marqués chez les patients

drépanocytaires avec ulcères de jambes par rapport à ceux sans ulcères de jambes (247,248,256,266,267). Il a été observé que l'ADMA, un inhibiteur de la synthèse de NO relargué par l'hémolyse, est augmenté chez les patients drépanocytaires avec ulcère de jambe (123). Le déficit en NO qui en résulte favorise la survenue d'ulcère de jambe par altération de la vasodilatation, augmentation de l'activation et de l'agrégation plaquettaire et de l'inflammation (268).

Le tissu autour des ulcères contient un infiltrat inflammatoire riche en leucocytes (253,259,269). Les cytokines pro inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8 et IL-15) sont augmentées dans le sérum des patients drépanocytaires par rapport à celui des patients drépanocytaires sans plaie (270–272). Également, l'IL-10, une cytokine anti inflammatoire, était augmentée (273) ; ce que l'on peut interpréter comme une tentative de contrôler l'inflammation.

La présence des ulcères est associée à une moindre déformabilité des GRs (140,274,275) et une diminution du rapport hématocrite-viscosité (140,270). Les GRs les moins déformables sont aussi les plus fragiles, favorisant ainsi l'hémolyse (134). De la même manière, de nombreuses études ont montré un lien entre une faible valeur d'HbF et le développement des ulcères de jambe (185,246,267,276,277).

4. Susceptibilité génétique

Parmi les caractéristiques génétiques qui modulent l'hémolyse, l'haplotype CAR β est associé à un moins bon pronostic avec <5% d'HbF et plus d'ulcères de jambes (278,279). Les patients HbSS et HbS β^0 ont un niveau d'hémolyse plus élevé et plus d'ulcères de jambe par rapport aux patients HbS β^+ et HbSC (185,248,251). La coexistence d'une α -thalassémie module le degré d'hémolyse ; les patients avec 2 gènes α délétés ont un moindre risque de développer un ulcère de jambe (246,280).

Les miRNAs sont de courtes séquences non codantes d'ARN conservées dans le génome. Ils régulent la post transcription de l'ARNm, rendant silencieux certains gènes. Des milliers de gènes codant pour des protéines sont régulés par des miRNAs. MiR-144 régule la production d'HbF (281). MiR-126 régule l'intégrité vasculaire et l'angiogenèse, il est beaucoup exprimé dans les cellules endothéliales (282). L'expression de miR-199a-5p et miR-144 sont augmentées chez les patients drépanocytaires avec ulcère alors que l'expression de miR-126 est diminuée (283). De la même manière, l'expression de miR-199a-5p et celle de miR-144 est associée aux marqueurs d'hémolyses et aux métabolites du NO. A l'inverse, miR-126 jouerait un rôle protecteur contre les ulcères de jambe.

Des gènes régulant le stress oxydant ont également été étudiés dans le contexte des ulcères de jambes chez les drépanocytaires. La Glutathion S-transférase (GSTs) a une activité peroxydase et protège contre les dommages du stress oxydant. La GST est formée de 2 sous unités parmi 7 classes. La

catégorie Thêta comprend les isoformes GSTT1 et GSTT2 qui ont une activité importante dans les GRs. La catégorie Mu (GSTM1 à 5) est plus active dans les hépatocytes et les isoformes sont très polymorphes (284). Il a été montré que le génotype nul pour la GSTM1 et GSTT1 multiplie respectivement par 7 et 5 le risque de faire un ulcère de jambe (285). Cela est en faveur du rôle du stress oxydant dans l'apparition des ulcères de jambe.

Sur le terrain de l'immunité, les patients drépanocytaires HLA-B35 et HLA-Cw4 ont 17 fois plus de risque d'avoir un ulcère de jambe. HLA-B35 augmenterait la susceptibilité à l'apoptose et la dysfonction endothéliale via l'endothéline-1 (286,287).

Les études divergent concernant le récepteur d'antigène Duffy des chimiokines (DARC). Les DARC sont l'un des sites principaux de fixation des cytokines. Les patients ayant une moindre expression de DARC dans les GRs ont un niveau de chimiokines plus élevé dans le plasma ; DARC diminuerait le signal immun en nettoyant les chimiokines (288). Alors qu'une équipe a montré une augmentation du risque d'ulcère pour les patients à haut niveau d'expression de DARC (289), d'autres études n'ont pas montré de modification de l'incidence des ulcères en fonction de l'expression de DARC (290,291). Enfin, un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) du gène de l'IL-6 a été identifié comme augmentant le risque d'ulcère de jambe (272).

L'équipe de Nolan a étudié 215 SNPs dans plus de 100 gènes candidats, sélectionnés pour leur rôle potentiel dans la physiopathologie de la drépanocytose : inflammation, stress oxydant, métabolisme du NO, vaso régulation, interactions cellulaires, coagulation, hémostasie, facteurs de croissance. En considérant un taux de faux positif de 10%, seul un SNP, adjacent à SMAD7 restait significativement associé aux ulcères de jambe. SMAD 7 appartient à la voie du TGF- β (*transforming growth factor β*). Parmi ses nombreux rôles, le TGF- β participe à la prolifération cellulaire, l'apoptose, la réponse aux lésions tissulaires, la croissance de l'endothélium, l'inflammation, la régulation immune et la synthèse de la matrice extracellulaire (MEC) (292). Une anomalie sur la voie du TGF- β est un bon candidat pour participer à la physiopathologie des ulcères de jambe des patients drépanocytaires.

Une susceptibilité génétique a également été montrée au niveau de la granulation et de l'épithélialisation des patients drépanocytaires. La surexpression du miR-130a est associée aux ulcères veineux chroniques et corrélée à la mauvaise régulation du processus de ré épithélialisation, la formation du tissu de granulation et la cicatrisation (293). Chez les patients drépanocytaires avec ulcère, le taux de miR-130a était multiplié par 4, suggérant un rôle de cette complication (294). Cette étude objective des points communs mécanistiques entre les ulcères veineux et les ulcères des patients drépanocytaires, participant au retard de cicatrisation.

Par technique de séquençage exome entier (uniquement la partie codante du génome), un variant a été identifié sur le gène de FLG2 comme associé aux ulcères des patients drépanocytaires. Ce gène est associé à la dermatite atopique des africains américains (295) ; il pourrait être impliqué dans la physiopathologie des ulcères en altérant la qualité de la barrière cutanée.

II. Facteurs concourant au retard de cicatrisation

1. Insuffisance veineuse

L'hémossidérine est un complexe de stockage du fer. Sur les berges des ulcères des patients drépanocytaires, la quantité d'hémossidérine est entre celle des ulcères artériels et celle des ulcères veineux (296).

Tout comme la stase veineuse évoquée précédemment, l'insuffisance veineuse est impliquée dans le retard de cicatrisation. Il a été observé que le repos au lit aide la cicatrisation des patients drépanocytaires, en faveur du rôle de l'hyperpression veineuse par l'œdème (251). L'hyperpression veineuse a été objectivée en mesurant la clairance de Technitium 99m ; elle montrait une altération de la fonction de la pompe du mollet (297). De plus, l'enregistrement des pulsations veineuses, la pléthysmographie veineuse et le laser doppler ont montré une accélération du temps de remplissage veineux (260,298).

Pour mieux comprendre l'origine de cette hyperpression veineuse, une incompetence valvulaire a été recherchée. Le diagnostic se fait par écho-Doppler à la recherche d'un reflux veineux. Deux équipes ont montré une association de l'incompétence valvulaire avec le risque d'ulcère de jambe chez le patient drépanocytaire (246,299). Toutefois, il ne s'agit certainement pas d'une caractéristique indispensable pour la survenue des ulcères de jambe. D'autres études sont nécessaires pour comprendre l'apparition des œdèmes chez les patients drépanocytaires avec ulcère de jambe. Une explication pourrait être l'incapacité du système veineux et lymphatique local à évacuer tout le sang artériel attiré par la plaie.

2. Colonisation bactérienne

De nombreuses études ont examinées la colonisation bactérienne des ulcères de jambe des patients drépanocytaires. Le *Staphylococcus Aureus* est la bactérie la plus commune (277,300–304), suivie par le *Pseudomonas Aeruginosa* (300–303). Les *Corynebacterium* (304,305), *Streptococcus beta*

hemolyticus (301,303) et *Escherichia coli* (277,300) ont chacun été rapportés au moins à 2 reprises. Les bactéries sont similaires à celles rapportées dans d'autres types d'ulcères (304).

L'équipe de Byeon a défini 2 sous-groupes d'ulcères. Le cluster 1 était caractérisé par une prédominance des *Staphylococcus* et une plus petite surface d'ulcère. Le cluster 2 avait une surface d'ulcère plus grande et une grande diversité microbienne (dont les aérobies *Corynebacterium* et *Alcaligenes* et anaérobies *Anaerococcus*, *Peptoniphilus* et *Porphyromonas*) (304). Cela pourrait être intéressant de tester si le profil microbien peut prédire l'évolution de l'ulcère de jambe. Mais ces 2 clusters peuvent refléter uniquement l'évolution naturelle de la plaie (cluster 2 puis cluster 1 pour chaque patient évoluant favorablement). La même équipe a montré que des ratios élevés *Corynebacterium/Lactobacillus* et *Staphylococcus/Lactobacillus* étaient corrélés à un antécédent d'ulcère de jambe chez les patients drépanocytaires sur peau intacte. Toutefois, aucun échantillon n'avait été prélevé avant l'apparition des ulcères, donc ces ratios peuvent être un terrain favorisant les ulcères ou la conséquence de l'ulcère. Également, le ratio *Lactobacillus/Bacillus* était élevé chez les patients drépanocytaires sans antécédent d'ulcère de jambe. Les *Lactobacillus* sont impliqués dans les mécanismes de protection contre les infections cutanées et le retard de cicatrisation, en modulant l'immunité, favorisant la ré-épithélialisation et le nettoyage des pathogènes (306).

Dans une cohorte française, une surface de plaie <8 cm² (OR 6,7, IC95 2,4-19,3) et une durée d'évolution < 9 semaines (OR 3,2, IC95 1,2-8,8) était associées indépendamment à une cicatrisation à 6 mois. Il n'y avait pas d'association entre la cicatrisation et les marqueurs biologiques d'hémolyse, l'HbF et les autres complications de la drépanocytose (307).

3. Altération de l'angiogenèse

L'équipe de Nguyen a étudié les mécanismes cellulaires et moléculaires des ulcères des patients drépanocytaires sur un modèle murin (souris SAD) (308). Un modèle de souris transgénique a été utilisé pour étudier les modifications vasculaires à l'état basal puis la cicatrisation après une plaie chirurgicale. Dans la peau, les vaisseaux lymphatiques et sanguins sont un peu moins denses chez la souris drépanocytaire que chez la souris saine. La prolifération des kératinocytes et des fibroblastes sont diminuées chez les souris drépanocytaires par rapport aux souris saines, tout comme le nombre de cellules endothéliales. La prolifération et la mobilisation des progéniteurs endothéliaux de la moelle osseuse est diminuée. En injectant des progéniteurs endothéliaux directement dans la plaie, la cicatrisation était accélérée en facilitant la prolifération des cellules épidermiques et l'angiogenèse. CXCL-12, IL-6, VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor-A*), VEGFR-2, Tie-1, Tie-2 et CXCR4 étaient

moins sécrétés dans la plaie de la souris drépanocytaire par rapport à la souris saine. En injectant du CXCL-12 (une chimiokine connue pour promouvoir l'angiogenèse), la cicatrisation était accélérée.

III. Traitements

Le traitement standard des plaies chroniques associe un traitement systémique et un traitement local. Un support nutritionnel et psychologique est essentiel. La colonisation bactérienne est un phénomène attendu et ne nécessite aucune antibiothérapie locale ou systématique en l'absence d'infection cutanée locale.

1. Traitements systémiques

1.1 Hydroxyurée

L'expérience clinique de l'HU avec les ulcères de jambe est controversée. Il serait attendu que l'HU réduise l'incidence des ulcères de jambe en augmentant l'HbF et en diminuant l'hémolyse et l'inflammation systémique, toutefois la littérature a rapporté plusieurs cas d'ulcère de jambe survenu après l'introduction d'HU (309–312). L'équipe de Soya a rapporté le cas d'un patient drépanocytaire qui a développé un ulcère de jambe 18 jours après l'introduction de l'HU ; l'ulcère a cicatrisé à l'arrêt de l'HU (313). Une explication serait l'accumulation de HU sous la peau ; il entrainerait une atrophie cutanée et une altération de la microcirculation par inhibition de la synthèse d'ADN et de sa réparation (313). Cela pourrait également être expliqué par un taux d'HbF restant insuffisant. Le taux d'HbF à atteindre serait évalué à 25% pour avoir un effet positif sur les ulcères de jambe, ce qui est rarement atteint (314).

L'étude ESCORT-HU est une étude de phase IV incluant 1906 patients drépanocytaires traités par HU pour évaluer la sécurité du traitement. Celle-ci est rassurante en ce qui concerne les ulcères de jambe ; seuls 33 patients ont développé des ulcères de jambe sous HU, soit 1.73 % à peine de la cohorte (315).

1.2 Transfusion

Il est admis depuis longtemps que la transfusion permettrait de traiter les ulcères résistants (252), bien qu'aucune étude contrôlée n'ait été conduite pour le tester. L'objectif est d'augmenter l'hémoglobine à 10 g/dL et de diminuer l'HbS <30%. En l'absence de cicatrisation à 6 mois de transfusion, celles-ci sont considérées en échec et peuvent être arrêtées (298).

1.3 Oxygénothérapie hyperbare

L'oxygénothérapie hyperbare est utilisée depuis de nombreuses années. Bien que controversée, elle a été validée pour la cicatrisation des plaies diabétiques (316). L'augmentation de la pression en oxygène dans la chambre de compression augmente la pression tissulaire en oxygène. L'oxygène hyperbare augmenterait l'angiogenèse, les facteurs de croissance, la prolifération des fibroblastes, l'activité bactéricide des neutrophiles et vasoconstricte pour réduire l'œdème vasogénique (317). Une étude a évalué 6 patients non drépanocytaires avec plaie chronique (3 diabétiques, 1 veineuse et 2 post chirurgicale) qui répondaient favorablement à l'oxygénothérapie hyperbare (318). La quantité de dérivés dans l'exsudat de la plaie augmentait à 1 et 4 semaines après l'oxygénothérapie hyperbare ce qui pourrait être intéressant pour les plaies drépanocytaires. Seulement, il n'y a pas de patients contrôles et les patients répondant favorablement ont été sélectionnés ; l'étude ne permet pas de savoir si l'augmentation des valeurs de nitrite et nitrate est secondaire à l'oxygénothérapie hyperbare.

Dans la drépanocytose, l'efficacité de l'oxygénothérapie hyperbare est limitée à quelques cas rapportés (319) .

1.4 Zinc (Figure 29)

Le zinc est apporté par l'alimentation, principalement les aliments riches en protéines. Il est absorbé dans l'intestin grêle et est excrété par la peau, le rein et les selles. Le zinc participe la régulation de la prolifération cellulaire. Il est impliqué dans l'intégrité et la stabilisation de la membrane cellulaire et la protection cellulaire (320). Il stabilise également la forme réduite du groupe sulfhydryle, permettant un effet anti oxydant et inhibant la peroxydation lipidique dans les GRs et dans le foie (321).

Dans la drépanocytose, une supplémentation en zinc permettrait de diminuer le risque d'infection (322) et de réduire la fréquence des CVOs (323).

Dans une étude contrôlée, l'administration de zinc oral permettait d'accélérer par 3 fois la cicatrisation par rapport au groupe contrôle (324). Eckman a proposé de supplémenter ces patients par 220 mg x 3 de sulfate de zinc (252).

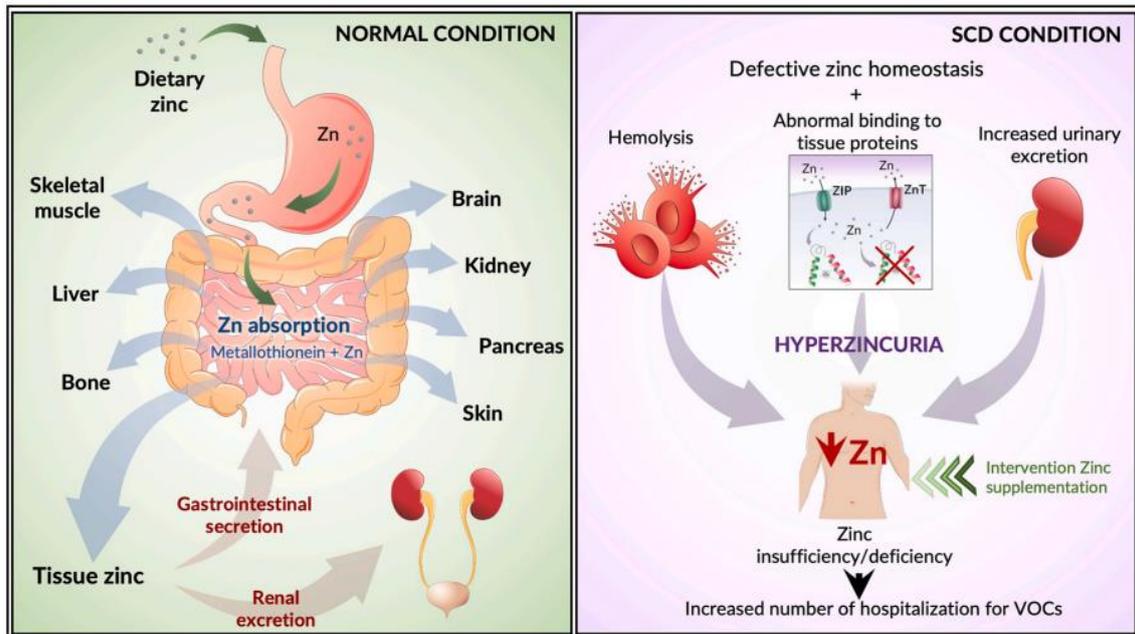


Figure 29 : Homéostasie du zinc en condition normale et déficit en zinc chez le patient drépanocytaire (321). Les patients drépanocytaires seraient tous carencés en zinc. Les causes sont l'hémolyse chronique (323), entraînant une perte de zinc par les GRs (zone de stockage du zinc), un défaut de réabsorption dans les tubules rénaux, une augmentation de l'excrétion urinaire et une fixation anormale aux protéines tissulaires.

2. Traitements d'avenir

2.1 Donneur de NO

Le NO augmenterait la production de matrice extra cellulaire, modulerait la réponse immunitaire, stimulerait la prolifération des kératinocytes et l'angiogenèse et aurait des propriétés bactéricides sur des modèles murins non drépanocytaires (325,326). En étude de phase I, l'application topique d'une crème de nitrite de sodium à différentes concentrations chez 18 patients drépanocytaires avec ulcère de jambe a augmenté la température autour de la plaie et a diminué la douleur et la taille de plaie de manière dose dépendante (216). Il permettait également d'améliorer la qualité de vie (327).

2.2 Voxelotor

Dans une étude de phase 3 du Voxelotor, il a été montré une amélioration clinique des ulcères de jambe (328). Une nouvelle étude dédiée a été mise en place, les recrutements sont en cours.

3. Traitements abandonnés systémiques

3.1 Arginine Butyrate

L'arginine butyrate a été développé pour stimuler la synthèse d'HbF chez les patients avec hémoglobinopathie. De manière non attendue, la cicatrisation d'ulcères évoluant depuis plus de 6 mois a été observée chez 7 patients avec drépanocytose ou β -thalassémie (329,330). Dans une étude de phase II dédiée, la cicatrisation complète était obtenue chez 30% des patients traités contre 8% dans le groupe contrôle, après 12 semaines (p 0,056). La réduction de la surface de la plaie d'au moins 25 % était observée chez 78 % des patients traités contre 24 % des patients contrôle (p <0,001) (331). Il n'y a actuellement pas de nouvelles recherches sur ce traitement.

3.2 Inhibiteur du récepteur à l'endothéline

Le cas d'une patient de 46 ans, souffrant d'ulcères de jambe depuis l'âge de 28 ans sans rémission depuis plusieurs semaines, a été rapporté (332). La greffe de peau, le GM-CSF (facteur stimulant les colonies de granulocytes et macrophages) et les transfusions n'ont pas permis d'obtenir de cicatrisation. Un traitement par Bosentan (un antagoniste des récepteurs à l'endothéline) a été débuté en raison d'une hypertension pulmonaire avec poursuite du programme de transfusion. Les ulcères ont cicatrisé en 3 semaines sans récurrence sur les 10 mois suivants. Il n'y a pas d'autre cas rapporté, ni d'étude prospective en cours pour ce traitement. Ce traitement à l'AMM est utilisé pour les ulcères digitaux chez les patients sclérodermiques.

3.3 Isoxsuprine

L'isoxsuprine est un vasodilatateur. Il améliorerait également la déformabilité des GRs et réduirait l'adhésion plaquettaire aux parois vasculaires (333). Une étude sur 54 ulcères chez 40 patients n'a pas montré de différence à 6 mois (334). Par contre, l'isoxsuprine était plus efficace que les antalgiques habituels pour réduire les douleurs aiguës d'une CVO (335).

3.4 Xanthinol Nicotinate

Le xanthinol nicotinate est un vasodilatateur. Il entraînait un taux significativement plus élevé de cicatrisation chez les patients avec hémoglobinopathie et ulcère de jambe dans une étude publiée en 1979 (336). Il n'a plus été testé par la suite dans cette indication ou chez les patients drépanocytaires.

3.5 Erythropoïétine

En 1991, le cas d'un patient de 23 ans avec drépanocytose sévère a été rapporté. Il faisait plus de 6 CVOs par an et avait une anémie sévère. La drépanocytose était responsable d'une pneumopathie interstitielle, d'une nécrose papillaire rénale, d'une ostéonécrose et un ulcère de la jambe droite ne cicatrisant pas depuis 5 ans (337). Le traitement vasodilatateur (molécule non précisée) et la greffe de peau n'ont pas permis d'obtenir la cicatrisation de l'ulcère. Ce patient a été inclus dans une étude pour

l'HU permettant d'interrompre les CVO et d'améliorer l'anémie. Six mois plus tard, ce même patient a été inclus dans une étude pour tester l'érythropoïétine recombinante humaine. Une amélioration de l'ulcère a été observée 2 semaines après l'initiation du traitement et une cicatrisation en 6 semaines sans récurrence pendant les 3 mois suivants a été observée. Il n'y a pas d'autre cas rapporté, ni d'étude prospective en cours pour ce traitement.

3.6 Antibiotiques

Publiée en 1987, une étude randomisée contrôlée a testé un spray de néomycine, bacitracine et polymyxine B chez 30 patients drépanocytaires SS avec ulcère de jambe, contre placebo. Une réduction significative de la taille des ulcères a été observée dans le groupe traité à 8 semaines (305).

3.7 La pentoxifylline

Le cas d'un homme drépanocytaire de 58 ans répondant à un traitement par pentoxifylline a été rapporté (338). Ses ulcères évoluaient depuis l'âge de 15 ans. Il n'y a pas d'autre cas rapporté, ni d'étude en cours.

La pentoxifylline retarde l'agrégation plaquettaire et a des effets sur la rhéologie du sang. Il réduit la viscosité sanguine en améliorant la flexibilité de la membrane du GR (339). La pentoxifylline inhibe la PKA et les phosphodiésterases de manière non sélective ce qui 1) augmenterait la concentration intracellulaire en ATP, 2) diminuerait la concentration en Ca^{2+} par activation de la Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase et la calmoduline, et 3) augmenterait la phosphorylation des protéines membranaires du GR (340).

Il a été utilisé pour le traitement de la claudication intermittente dans l'artériopathie des membres inférieurs mais a maintenant perdu son AMM en raison d'une amélioration du service rendu insuffisant.

3.8 L-carnitine

La L-carnitine est un agent antioxydant (341). Dans une étude pilote randomisée contre placebo ayant inclus 15 patients drépanocytaires, il n'y avait pas d'effet significatif de la L-carnitine sur la cicatrisation (342).

3.9 Chélateurs du fer

Un traitement chélateur est fréquemment associé dans la drépanocytose en raison d'une surcharge en fer en lien avec les transfusions chroniques. La deferoxamine est un chélateur du fer qui favoriserait la cicatrisation des plaies diabétiques en stimulant HIF-1 α et donc l'angiogenèse (343). Chez la souris drépanocytaire, la deferoxamine réduit la durée de cicatrisation (344).

3.10 Antithrombine III

Cacciola a observé un déficit en antithrombine III chez des patients drépanocytaires avec ulcère de jambe (345). La correction du déficit en antithrombine III administré avec de l'héparine calcique a permis d'obtenir une cicatrisation en 6 semaines sans récurrence à 6 mois. Il n'y avait pas de groupe contrôle.

Par la suite, ce déficit n'a pas été retrouvé (256) et le traitement n'a pas été à nouveau rapporté.

3.11 Anticoagulation

Une étude publiée en 1957 avait rapporté que l'administration au long cours d'un anti vitamine K, le Dicoumarol, diminuait l'incidence des ulcères de jambe (346). Il n'y aucune donnée qui soutiendrait l'utilisation d'un anticoagulant pour les ulcères de jambe des patients drépanocytaires.

4. Traitements locaux

4.1 Compression veineuse

Elle ne repose sur aucune étude clinique, pourtant il est communément admis que la compression veineuse est indispensable à la cicatrisation des patients drépanocytaires. Il a été observé la présence d'œdème, mal expliqué, qui apparait peu après la survenue de la plaie (347). Elle permet donc de limiter l'œdème et par là même l'écoulement de l'exsudat à travers la plaie et la macération, tous deux irritants pour la plaie et entraînant une évolution défavorable. La pression appliquée est autour de 30 à 40 mmHg par extension de ce qui a été démontré pour les ulcères veineux (348).

Elle est sans risque car l'artériopathie des membres inférieurs est rarissime chez ces patients. Toutefois, il est sage de vérifier la présence des pouls et procéder à un écho-Doppler artériel des membres inférieurs avec calcul des index de pression en cheville ou orteil en cas de doute. Elle est habituellement appliquée sous la forme de bandes de compression afin également de ne pas arracher le pansement lors de l'enfilage de la chaussette de compression. Elle nécessite le passage d'une infirmière à domicile et peut être gardée 2 jours de suite.

La compression ne dispense pas le patient de marcher pour favoriser le retour veineux et de surélever les jambes autant que possible. Il est indispensable de bien mobiliser les chevilles pour limiter l'ankylose, ce qui diminuerait d'avantage le retour veineux à la marche. Il est parfois nécessaire d'envisager un arrêt de travail d'une à 2 semaines.

Après cicatrisation, l'idéal est de poursuivre le port de la compression sous la forme d'une chaussette de compression pour favoriser l'observance.

4.2 Le choix du pansement

Le choix du pansement est variable en fonction de l'état de la plaie et doit s'adapter à son évolution. Le choix se porte le plus habituellement sur alginate lorsque la plaie est fibrineuse et exsudative, un hydro fibre lorsqu'elle est très exsudative et des pansements imbibés d'inhibiteurs de métalloprotéases pour accélérer la cicatrisation. Ils peuvent être recouverts par un pansement secondaire super absorbant afin de drainer l'exsudat (348).

Il est indispensable que le patient comprenne bien le pansement et la compression afin de favoriser la compliance et donc la cicatrisation. Le pansement est également à adapter aux douleurs du patient, par exemple, si le retrait est difficile.

4.3 Matrice Extracellulaire Synthétique

La RGD peptide matrix est une matrice extracellulaire synthétique topique substituant la matrice altérée et offrant un support pour la croissance cellulaire au site de l'ulcère. Le RGD (acide arginyl-glycyl-aspartic) est le motif peptidique le plus commun responsable de l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire. Il s'agit d'un RGD contenant des peptides complexés avec de l'acide hyaluronique dans un gel visqueux. Il est appliqué sur l'ulcère avec une seringue à usage unique. Sur modèles in vivo et in vitro, la RGD peptide matrix améliore les processus de la cicatrisation comme la migration cellulaire, la granulation, la formation de la couche de kératinocytes et la contraction de la plaie (349).

En 1994, une étude randomisée contrôlée en double aveugle de la RGD peptide matrix pendant 10 semaines chez 55 patients drépanocytaires a été publiée (350). La cicatrisation était significativement accélérée avec la RDG peptide matrix en comparaison à un placebo, autant pour les ulcères récents que les ulcères évoluant depuis longtemps.

Cette matrice a également été testée dans les brûlures (351) et les plaies diabétiques (352). Les recherches n'ont pas été poursuivies dans aucune de ces indications.

4.4 Laser faible énergie

Le laser faible énergie aussi appelé photothérapie ou photo modulation utilise des photons non chauffants. Le laser faible énergie permet de réduire la douleur, l'inflammation, et augmenter la réparation et la régénération tissulaire et nerveuse (353) (Figure 30). Il est également utilisé pour le traitement des cicatrices, de l'acné inflammatoire et fines rides.

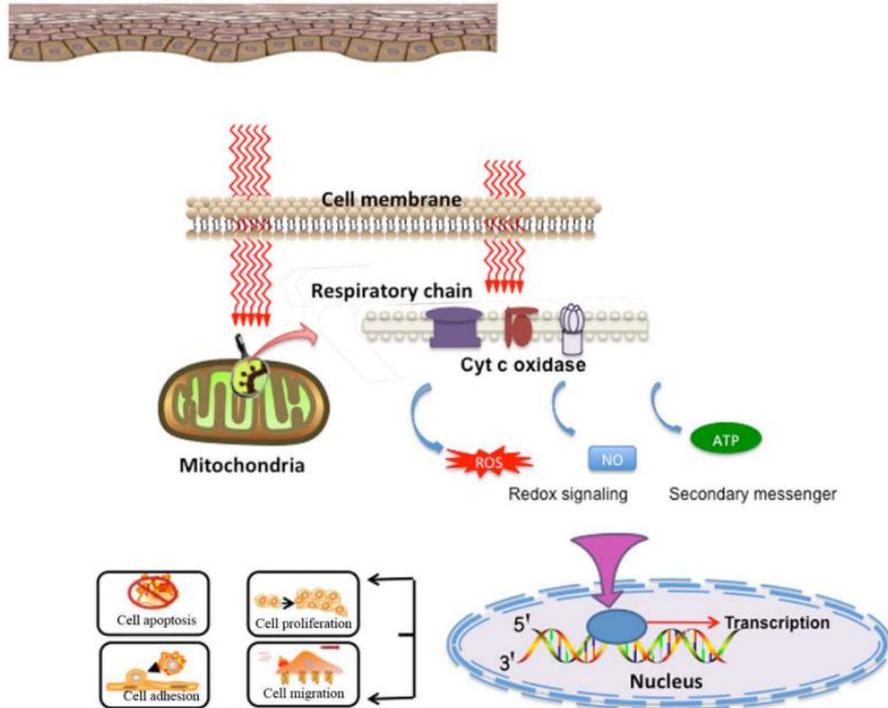


Figure 30 : Mécanisme d'action du laser faible énergie (353). La lumière rouge agit sur les mitochondries et en particulier la cytochrome C oxydase contenue dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie. La lumière rouge entrainerait la photodissociation de l'inhibition par le NO de la cytochrome C oxydase entrainant la production d'ATP avec un effet antioxydant.

Le laser faible énergie a été évalué avec succès pour les ulcères de pression (354), les ulcères veineux (355), les ulcères diabétiques (356) et les aphtes récurrents (357). Il n'y a pas d'étude en cours pour les ulcères des patients drépanocytaires. Le seul cas rapporté concerne une patiente de 35 ans avec ulcère de jambe récurrent (358). Le laser était appliqué par séquences de 9 secondes à 5-10 mm d'intervalle sur les berges de l'ulcère. Cinq sessions au total ont été réalisées, à raison de 2 par semaine pendant 10 à 15 minutes. La taille de l'ulcère a diminué sans obtenir de cicatrisation complète.

4.5 Oxygène transdermique en continu

Il s'agit d'un mini extracteur d'oxygène délivrant en permanence de l'oxygène sous le pansement. L'oxygène diffuse via l'exsudat.

Ce système a été testé sur un patient drépanocyttaire avec 3 ulcères de jambe (2 à gauche et 1 à droite) pendant 15 semaines (359). Il a été placé sur les plaies de la jambe gauche qui ont cicatrisé sans récurrence pendant les 42 mois de suivi. L'équipe de Igwegbe a utilisé ce système sur 5 patients drépanocytaires et a observé une cicatrisation ou une amélioration d'ulcères anciens/récurrents (360).

Sur des ulcères veineux ou mixtes, il a été montré que l'oxygène trans épidermique diminue l'hypo perfusion (361). L'utilisation pour les plaies diabétiques n'a montré un bénéfice que chez les patients de plus de 65 ans (362).

Les dispositifs Natrox et Epiflo sont disponibles en France mais ne sont pas remboursés.

4.6 Thérapie cellulaire autologue

La transplantation de cellules souches autologues de la moelle osseuse a été évaluée dans une étude pilote de sécurité et faisabilité chez 23 patients drépanocytaires (363). Durant le suivi de 6 mois, 91,3% des patients ont amélioré leurs douleurs et 29,2% ont cicatrisé. Par ailleurs, les patients avec ulcères avaient moins de cellules souches que les patients drépanocytaires sans ulcère.

La technologie d'implantation de cellules souches autologues a également été utilisée chez le patient drépanocytaire pour ralentir l'évolution de l'ostéonécrose (364).

Pour les autres plaies cutanées, la technique semble prometteuse pour les ulcères diabétiques (365) et pour les ulcères artériels sans possibilité de revascularisation (366).

4.7 Le miel

L'effet du miel a été comparé à une solution antiseptique dans une étude ouverte chez 20 patients drépanocytaires, cliniquement stable avec ulcère de jambe. Les patients ont été hospitalisés pendant 4 semaines avec repos au lit et pansement quotidien. Parmi les 15 patients évaluable en fin d'étude (19 ulcères), 11 ulcères avaient un pansement au miel et 8 avec l'antiseptique. Il n'y avait pas de différence de cicatrisation entre les 2 groupes (367).

4.8 La greffe de peau

La greffe de peau est bien décrite dans les plaies vasculaires non drépanocytaires pour favoriser la cicatrisation et limiter la douleur (368). Elle peut se faire en pastille ou en filet. Le site de prélèvement de greffe est habituellement la cuisse.

La plus grande série rapportée est l'étude SCULP, qui a étudié l'effet des greffes de peau en pastille chez 25 patients drépanocytaires (35 ulcères) entre J0 et J30 (368). Les patients inclus avaient un ulcère évoluant depuis 4 semaines (ou 2 semaines en cas de récurrence). La taille moyenne des ulcères était de 7.8 cm² (3.1—19.4) ; soit des ulcères de bon pronostic. A J7, il a été observé une diminution significative de la douleur ainsi que de la consommation d'antalgique. A J30, il a également été observé une réduction significative de la taille des plaies. Prenant en compte les résultats d'une cohorte parisienne (307), les patients inclus dans l'étude SCULP étaient des patients à bon pronostic de cicatrisation dans les 6 mois (plaies de petite taille, évolution courte), donc on pouvait s'attendre à un même taux de

cicatrisation, y compris en l'absence de greffe de peau. L'absence de bras contrôle ne permet pas de savoir si la greffe de peau permet d'accélérer la cicatrisation.

En s'inspirant de données chez 21 patients non drépanocytaires atteints d'ischémie critique (369), il est suggéré que la greffe de peau permettrait un moindre taux de récurrence, et encore d'avantage si le lit de la plaie a été préparé par une thérapie à pression négative. Le protocole consistait en 1) un débridement de la plaie, 2) une thérapie par pression négative à 125 mmHg en continu et 3) une greffe de peau.

Le cas d'un patient drépanocytaire de 28 ans a été rapporté (370). Il était traité par acide folique, hydroxyurée et un chélateur du fer. Il avait 3 ulcères évoluant depuis 5 ans, exposant les tendons (Figure 31A). Une plaie était recouverte par pansement simple imbibé par sérum salé isotonique, la deuxième, par alginate de calcium et la troisième traitée par pression négative durant 7 jours. L'ensemble des plaies ont été greffées (peau prélevée sur la cuisse droite par un dermatome électrique, puis expansée).



Figure 31A : Les 3 plaies avant la greffe de peau (370)

Neuf mois après, les plaies non traitées par pression négative ont récidivé, résistantes au traitement habituel (Figure 31B).



Figure 31B : Evaluation 9 mois après la greffe, récurrence des 2 plaies non traitées par pression négative (370)

Le patient a bénéficié d'une nouvelle greffe de peau sur ces 2 sites avec préparation par pression négative (Figure 31C) ; il n'y a pas eu de récurrence pendant les 18 mois suivants.



Figure 31C : Cicatrisation obtenue sur les 3 sites, 8 mois plus tard (370)

En pratique, les données sont de faible qualité et la greffe de peau est réservée à des ulcères résistants chez des patients observants aux protocoles de pansement et de compression.

Une partie des éléments développés dans ce chapitre a été publiée sous la forme d'une revue acceptée dans le British Hematological Journal (PDF en annexe).

Chapitre 4 – La microcirculation cutanée

I. Anatomie

1. Anatomie de la peau

La peau est le plus grand organe du corps. Elle remplit une multitude de fonctions vitales :

- Barrière de protection entre le corps et l'environnement extérieur contre les dommages physiques, les agents pathogènes, la perte de liquide.
- Régulation de la température corporelle
- Détection des stimuli grâce à ses nombreux récepteurs sensoriels (douleur, toucher, pression)
- Fonction neuroendocrine ; elle est capable de produire plusieurs hormones en réponse à différents stress environnementaux. Elle contient les enzymes clés de la synthèse des corticostéroïdes et peut activer l'hypophyse et le cortex surrénalien par voie nerveuse ou par des facteurs dérivés de la peau. Cette fonction contribue au maintien de l'homéostasie du corps (371).
- Synthèse de la vitamine D

La peau est composée de 3 couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 32).

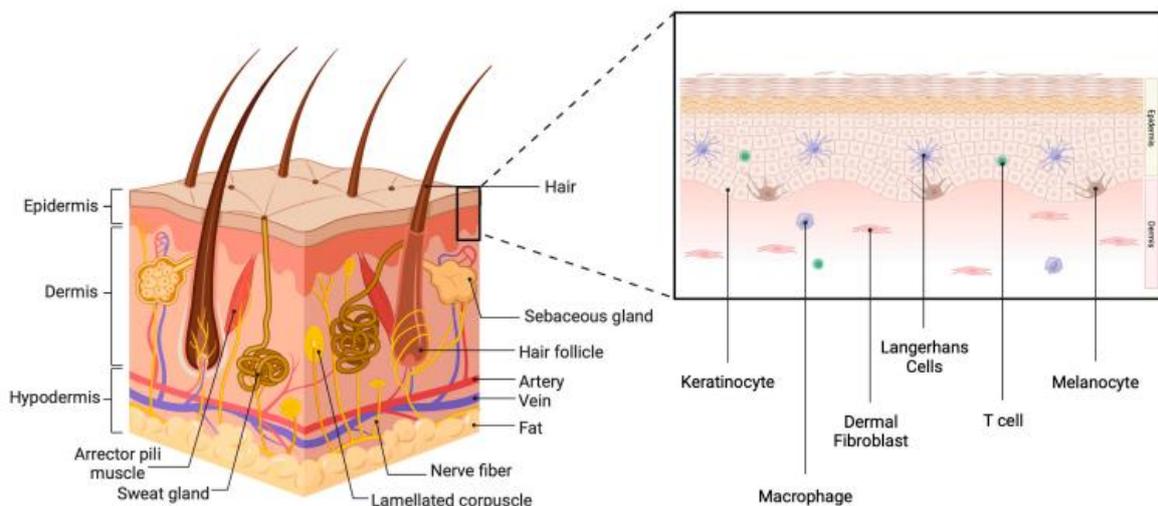


Figure 32 : Schéma des couches de la peau (372)

L'épiderme (épithélium pluristratifié, non vascularisé) est la couche la plus superficielle de la peau. Il est constitué de différentes couches cellulaires. Les kératinocytes sont les cellules prédominantes qui

s'engagent continuellement dans un processus de différenciation vertical en plusieurs étapes, de la lame basale vers la couche externe, formant ainsi les quatre strates de l'épiderme (couche basale, couche épineuse, couche granuleuse et couche cornée); ils produisent de la kératine et des lipides pour former une barrière cutanée étanche à l'eau. Les mélanocytes synthétisent de la mélanine en réponse aux UVB pour protéger la peau. Les cellules de Langerhans sont la première ligne de défense immunitaire et sont indispensables pour la présentation des antigènes. Les terminaisons nerveuses et les cellules de Merkel (mécanorécepteurs) ont un rôle sensoriel.

Le derme est connecté à l'épiderme par la jonction dermo-épidermique (lame basale). Il s'agit d'un tissu conjonctif composé de fibres de collagènes et de fibres élastiques. Il abrite les glandes sudoripares, les glandes sébacées, les follicules pileux, les muscles érecteurs des poils, des fibres nerveuses autonomes (sympathique et parasympathique) et sensibles et des vaisseaux sanguins et lymphatiques. On y trouve également des cellules mastocytaires, les fibroblastes, les cellules présentatrices d'antigène et les cellules immunitaires résidentes et circulantes (373)

Le tissu adipeux sous-cutané (hypoderme) correspond au fascia sous cutané ; il sépare le derme des tissus et muscles sous-jacents. Il contient des lobules adipeux, des fibres nerveuses et des vaisseaux sanguins. Ce tissu fonctionne comme un réservoir énergétique. Les adipocytes stockent les nutriments en excès sous forme de lipides (triglycérides), qui peuvent être clivés en adénosine triphosphate (ATP), source majeure d'énergie cellulaire. L'hypoderme a également un rôle d'amortisseur vis-à-vis des chocs mécaniques, et thermorégulateur en modulant la balance lipogénèse/lipolyse selon l'environnement extérieur

La peau est innervée par différents types de fibres : les fibres nerveuses sensibles, transmettant toutes les modalités sensorielles et les fibres nerveuses autonomes (374). Les fibres nerveuses autonomes proviennent de neurones sympathiques. Leur terminaison se limite au derme. Elles sécrètent localement différents neuromédiateurs (375). Les fibres nerveuses sensibles innervent également l'épiderme. Elles ont des terminaisons libres ou encapsulées (corpuscules de Pacini, Meissner, Ruffini et disques de Merkel). Elles peuvent être classées en thermorécepteurs, réagissant au chaud/froid, en mécanorécepteurs, réagissant à la pression, l'étirement ou au mouvement des poils, en nocicepteurs (seuil d'activation plus élevé, initiant des sensations douloureuses) et en pruricepteurs, responsable de la sensation de prurit (376).

En outre, le kératinocyte possède de nombreux récepteurs lui permettant de détecter les différents facteurs de l'environnement (377).

Des contacts anatomiques semblables à des synapses ont été décrits entre les terminaisons et plusieurs types cellulaires (378). Une stimulation entraîne la production et la libération de

neuromédiateurs par les fibres nerveuses, agissant sur des cellules cibles neuronales et non neuronales (378).

2. Anatomie de la microcirculation cutanée

Le derme et le tissu adipeux dermique sont richement vascularisés par un réseau sanguin très structuré d'artérioles de moyen puis petit calibre, de capillaires et de veinules. A l'inverse, l'épiderme, comme tout épithélium, n'est pas vascularisé ; il est nourri par imbibition à partir des réseaux capillaires (379).

En conditions physiologiques, la microcirculation cutanée est organisée en 2 plexus (Figure 33) (379).

Le plexus profond (40-50 μ m de diamètre), qui est situé entre le derme et l'hypoderme, est formé d'artérioles et de veinules provenant du réseau sanguin des muscles et du tissu adipeux. Le prolongement horizontal de ce plexus profond permet d'une part, d'approvisionner les bulbes pileux et les glandes sudoripares, et d'autre part, d'assurer la formation du plexus superficiel au contact de la jonction dermo-épidermique. Cette proximité entre le plexus superficiel et les kératinocytes de la couche basale assure le transport des nutriments à l'épiderme avasculaire.

Le plexus superficiel est formé d'artérioles et veinules de petit diamètre (15-20 μ m), et de boucles de capillaires (5-10 μ m) qui s'étendent de manière perpendiculaire à la surface de la peau. En plus de sa fonction nutritive, le plexus supérieur contribue principalement à la thermorégulation. Dans les peaux glabres dépourvues de poil (paume des mains, voute des pieds...) des anastomoses artérioveineuses, connexions directes entre les artérioles et veinules, contribuent également à la thermorégulation (380).

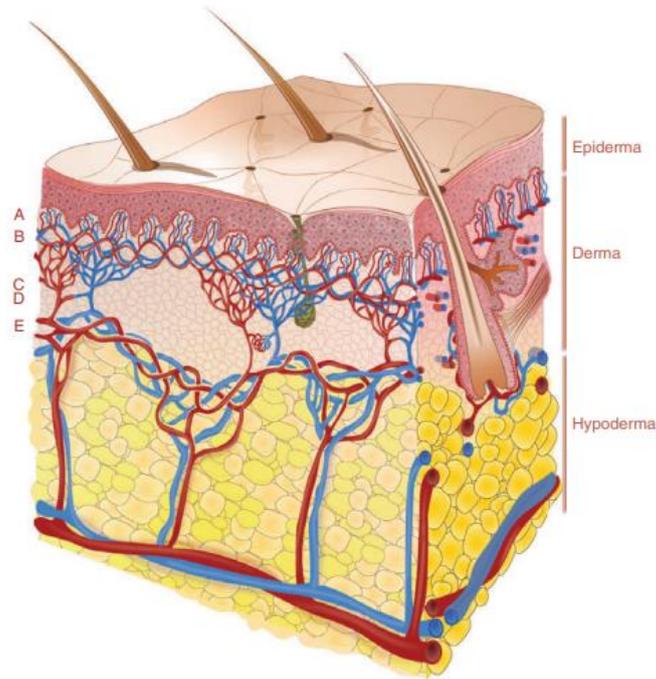


Figure 33. Anatomie de la microcirculation cutanée, comprenant le **plexus horizontal profond** (E) parallèle à la peau, à l'interface derme-hypoderme, d'où naissent les artérioles ascendantes (C) formant le **plexus superficiel** (B) dans le derme. Les boucles capillaires (A) sont perpendiculaires à la surface de la peau à l'exception de la région péri-unguéale. Des anastomoses artério-veineuses (D) existent au niveau du plexus superficiel, surtout dans la paume de la main et sous le pied. (381)

La microcirculation cutanée est composée des plus petites vaisseaux (<150µm de diamètre) : artérioles, capillaires et veinules. Les artérioles sont principalement impliquées dans la régulation du flux sanguin et la perfusion tissulaire alors que les capillaires sont le site des échanges d'oxygène et de nutriments. Les petites veinules permettent la diapédèse des leucocytes.

ARTERIOLES	Endothelium ■ Elastic tissue ■ Smooth muscle ■ Fibrous tissue ■	
CAPILLARY	Endothelium ■ Elastic tissue ■ Smooth muscle ■ Fibrous tissue ■	
VENULE	Endothelium ■ Elastic tissue ■ Smooth muscle ■ Fibrous tissue ■	

Figure 34 : Vaisseaux sanguins dans la microcirculation cutanée (382)

De manière générale, les vaisseaux sanguins ont 3 tuniques : l'adventice à l'extérieur, la média et l'intima. La structure varie en fonction du type de micro vaisseau (Figure 34). Les capillaires ne sont composés que d'une monocouche de cellules endothéliales (l'endothélium) entourée d'une membrane basale.

L'adventice est composée d'élastine, de collagènes, de fibroblastes, de cellules mastocytaires et de macrophages dont la proportion varie en fonction du site. L'adventice reçoit de nombreux axones nerveux sensitifs sympathiques et parasympathiques.

La contiguïté avec la média permet l'interaction avec les cellules vasculaires musculaires lisses dont elle est principalement composée pour le contrôle nerveux du tonus microcirculatoire cutané. L'intima est formée d'une couche simple de cellules endothéliales (l'endothélium) posée sur la limitante élastique interne.

Les péricytes sont des cellules multipotentes impliquées dans la régulation du tonus vasculaire et la régénération tissulaire. Ils régulent le diamètre des capillaires via des voies calciques dépendantes, ainsi que la fonction barrière de l'endothélium et de la membrane basale et la prolifération et différenciation de l'endothélium (383). Ils sont présents dans les artérioles terminales, les capillaires et les veinules post capillaires.

Le système lymphatique est présent dans le derme et le tissu adipeux dermique et absent de l'épiderme. Bien que structurellement distincts, les systèmes sanguin et lymphatique sont fonctionnellement interconnectés et agissent ensemble pour assurer l'équilibre des fluides et des protéines dans les tissus, la nutrition cellulaire et le bon fonctionnement immunologique (384). La circulation lymphatique est formée de capillaires lymphatiques horizontaux sous l'épiderme rejoignant des vaisseaux pré collecteurs dans le derme plus profond puis des vaisseaux lymphatiques collecteurs dans la couche grasseuse sous cutanée. Les vaisseaux lymphatiques rejoignent le canal thoracique via des nœuds lymphatiques (385).

II. La cellule endothéliale

1. Régulation de la perméabilité vasculaire

La cellule endothéliale est le régulateur principal de l'homéostasie vasculaire, interagissant avec les cellules circulantes et les cellules de la paroi vasculaire. Elle forme une barrière sélective entre le sang et le tissu : l'épithélium. La surface est estimée à 350 m² chez l'humain (386). Trois types de jonction ont été décrits entre les cellules endothéliales : les jonctions serrées (*tight junctions*) qui régulent le

passage de solutés à travers l'épithélium (387), les jonctions adhérentes (*adherens junctions*) et les jonctions communicantes (gap junctions) qui permettent le passage d'ions et petites molécules entre 2 cellules adjacentes (388). Des stimuli produits en réponse à l'inflammation comme l'histamine, le facteur natriurétique atrial et la thrombine entraînent une augmentation rapide de la perméabilité vasculaire (389).

2. Anticoagulante et anti thrombotique

Les antiplaquettaires principaux sont la PGI₂ (prostacycline) et le NO (390). Ils sont libérés de manière constitutive par l'endothélium. Leur synthèse est augmentée en réponse à des molécules impliquées dans la coagulation pour limiter l'extension du thrombus. De plus, la thrombomoduline, un récepteur à la thrombine, est situé sur la cellule endothéliale permettant l'activation de la protéine C, un anticoagulant naturel qui fonctionne lorsqu'elle est complexée avec la protéine S, synthétisée par la cellule endothéliale (391). La surface des cellules endothéliales est riche en glycosaminoglycanes héparine-like auxquels est fixé l'antithrombine. Enfin, la cellule endothéliale synthétise l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI - *tissue factor pathway inhibitor*) (392) et a des récepteurs pour endocyter le facteur Xa. La cellule endothéliale participe à la fibrinolyse en libérant l'activateur du plasminogène tissulaire (t-PA - *tissue-type plasminogen activator*) et de l'urokinase (393).

L'activation de la cellule endothéliale entraîne, d'une part, un phénotype pro-agrégant plaquettaire et la libération de facteur activateur des plaquettes (PAF - *platelet-activator factor*) et de thromboxane A₂ et, d'autre part, un phénotype pro thrombotique par la suppression des mécanismes anti coagulants (394), la libération de facteur Von Willebrand (vWF) stocké dans les corps de Weibel-Pallade (stabilise le facteur VIII) et la production et expression à sa surface du facteur tissulaire (active le facteur X, avec le facteur VII). L'exposition du collagène du sous endothélium active également le phénotype pro thrombotique (Figure 35).

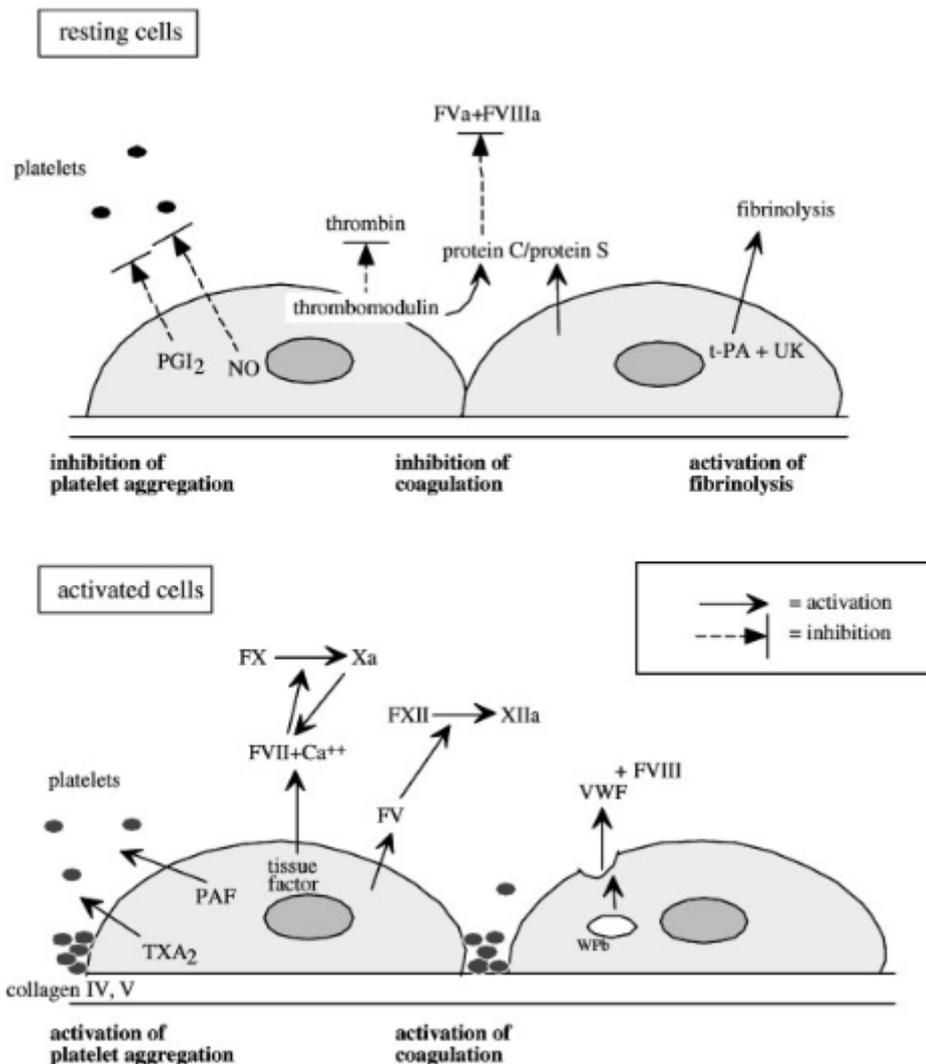


Figure 35 : Représentation du rôle de la cellule endothéliale dans les voies de la coagulation et de la fibrinolyse NO, nitric oxide; PAF, platelet activating factor; PGI₂, prostacycline; t-PA, tissue plasminogen activator; TXA₂, thromboxane A₂; UK, urokinase; vWF, von Willebrand factor; WPb, Weibel-Palade body (389).

Au repos, la cellule endothéliale a une activité anti plaquettaire (libération constitutive de PGI₂ (et le NO), inhibe la coagulation (fournit la thrombomoduline et la protéine S pour activer la protéine C) et active la fibrinolyse (libération de t-PA et urokinase).

L'activation de la cellule endothéliale transforme son phénotype vers une activation de l'agrégation plaquettaire (libération de TXA₂, PAF et facteur tissulaire) et une activation de la coagulation (libération de vWF).

3. Adaptation à la contrainte de cisaillement

La contrainte de cisaillement est le produit de la viscosité sanguine par la vitesse de cisaillement ; cette dernière dépend du débit sanguin et du rayon vasculaire. L'augmentation de la contrainte de cisaillement stimule la libération de PGI₂ et le NO par les cellules endothéliales. Sous l'effet de la

contrainte de cisaillement, les cellules endothéliales perdent leur forme polygonale et s'allongent dans le sens du flux (395).

La libération du NO est augmentée par stimulation de l'expression du gène de la eNOS (396). L'activation de la eNOS se fait par phosphorylation de Ser633 ou Ser1177 par des kinases comme la phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K)/Akt, la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), la protéine kinase A (PKA) et la kinase II dépendante de la calmoduline (CaMKII). La phosphorylation est activée par un influx de Ca^{2+} (397).

La contrainte de cisaillement entraîne également la libération de facteurs inhibant la coagulation, la migration des leucocytes, et la prolifération des cellules musculaires lisses tout en favorisant la survie de la cellule endothéliale (389). A l'inverse, en cas de faible contrainte de cisaillement, l'ensemble des mécanismes s'inverse, entraînant un risque pathologique de dysfonction vasculaire (398).

4. Participation à l'inflammation

La cellule endothéliale coordonne le recrutement des cellules inflammatoires dans la lésion et produit et libère des cytokines et facteurs de croissances pour communiquer avec les leucocytes (399). Enfin, l'adhésion et la migration des leucocytes à travers l'endothélium se fait grâce à des molécules d'adhésions exprimées sur les cellules endothéliales (389). Ce phénomène est décrit plus en détails dans le chapitre sur la cicatrisation.

5.Néo angiogenese

La néo angiogenèse nécessite la libération de protéases par la cellule endothéliale activée pour dégrader la membrane basale. Ensuite, les cellules endothéliales migrent dans l'espace interstitiel, prolifèrent et se différencient en vaisseau sanguin mature (400). Un paragraphe est dédié à la néo angiogenèse après une plaie dans le chapitre 5 sur la cicatrisation.

III. Le vaso-reflexe veino artériel

La régulation de la pression capillaire se fait grâce au réflexe veino-artériel. En effet, lorsque la pression veineuse est élevée, cela devrait entraîner une filtration du plasma depuis le sang dans les tissus interstitiels jusqu'à une surcharge tissulaire, c'est-à-dire que le plasma s'accumule dans les tissus (401).

Heureusement, il existe ce réflexe veino-artériel permettant qu'en position debout il n'apparaisse pas systématiquement d'œdèmes des membres inférieurs. Une vasoconstriction artériolaire limite l'augmentation de la pression ; elle a pour objectif de protéger l'intégrité capillaire et la filtration trans capillaire dans les limites de la normale (402). Ce phénomène est 2 fois plus important dans les membres inférieurs que dans les membres supérieurs. Ce phénomène serait contrôlé par un mécanisme myogénique et une vasoconstriction d'origine nerveuse non adrénérique (403).

Il a été démontré que ce réflexe est altéré en région perimalléolaire en cas d'hyperpression veineuse (404) ainsi que chez le patient drépanocytaire (262).

III. Régulation du flux sanguin cutané

La régulation du flux sanguin est complexe, sous l'influence des nerfs sensitifs et sympathique en interaction avec l'endothélium, les cellules musculaires lisses et la régulation métabolique.

1. Contrôle nerveux

Les artéioles du derme sont innervées par les terminaisons nerveuses libres issues des fibres nerveuses sensitives et du système nerveux autonome qui jouent un rôle important dans la régulation du flux sanguin cutané en réponse à différents stimuli comme la modification de température, l'inflammation cutanée ou la pression (375).

Dans la peau, l'activité sympathique spontanée entraîne une vasoconstriction noradrénérique (d'où la sympathectomie en cas d'ischémie critique non revascularisable) (405). Cette activité peut augmenter la vasoconstriction en réponse au froid et à l'inverse participer à la vasodilatation non adrénérique en réponse à la chaleur (406).

Outre les fibres nerveuses du système autonome, les fibres sensorielles peuvent réguler le flux sanguin cutané. En effet, la vasodilatation, peut être médiée par les neuropeptides CGRP (*calcitonine gene related peptide*) et la substance P (SP). Ces neuropeptides peuvent être libérés suite à la dépolarisation de la fibre nerveuse par les *Transient receptor potential ion channels* (TRPV1, 3 et 4 dans la peau), des canaux cationiques notamment sensibles au changement de température (407).

En cas de plaie, l'inflammation neurogénique et le réflexe axonal participent ensemble au recrutement des cellules immunitaires (408). Le réflexe axonal court-circuite la moelle épinière. Une seule

terminaison nerveuse serait capable de ressentir le signal et de médier une réponse vasculaire locale (409).

A l'inverse, le neuropeptide Y favorise la vasoconstriction (410,411).

2. Régulation endothélium dépendante

Il existe 3 voies de vasodilatation endothélium dépendantes (Figure 36).

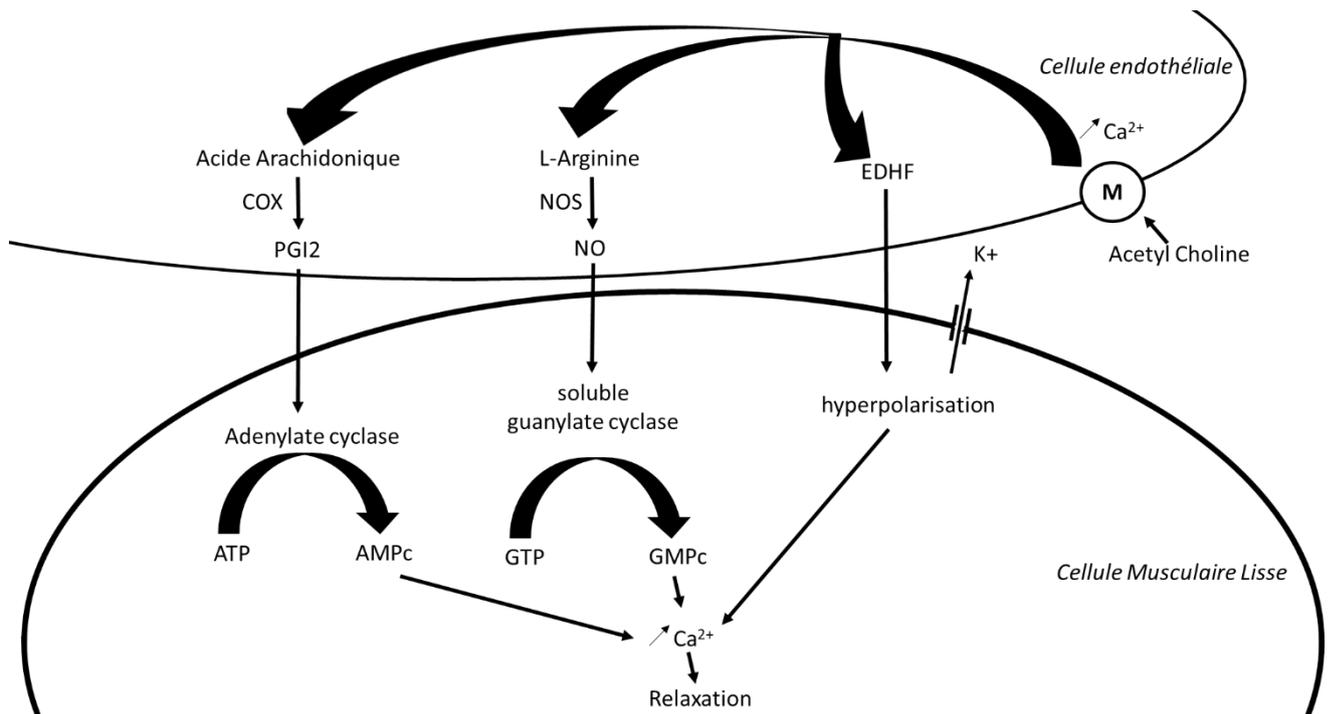


Figure 36 : Voies de signalisation aboutissant au relâchement des cellules musculaires lisses sous endothéliales

2.1 Monoxyde d'azote (Oxyde nitrique (NO) en anglais)

Le monoxyde d'azote (nitric oxide (NO) en anglais) est un radical libre connu pour son rôle majeur dans la régulation de la vasomotricité. Il diffuse librement dans les cellules. Sa demi-vie dans le sang est très courte (< 2 msec) (412).

Production du NO

Le NO est produit par les oxyde nitrique synthases. On distingue une forme inducible (iNOS), une forme neuronale (nNOS) et une forme endothéliale (eNOS) (413). Ces enzymes sont actives dans de nombreux types cellulaires dont les plaquettes, neurones, macrophages, cellules myocardiaques, cellules endothéliales et globules rouges.

La **nNOS** est exprimée constitutivement. Le NO produit a un rôle de neurotransmetteur ; il module la libération d'acétylcholine, noradrénaline, glutamate et GABA et régule la plasticité synaptique (414).

La **iNOS** est exprimée en raison à un stimulus. Dans les macrophages, par exemple, le NO est produit en réponse à des cytokines ou endotoxine pour jouer un rôle immunitaire cytotoxique.

La **eNOS** est exprimée constitutivement dans les cellules endothéliales. La eNOS est la seule NOS associée à la membrane cellulaire ; les autres sont solubles dans le cytosol (415). Comme nous l'avons dit plus tôt, le NO peut être produit en réponse à un stress mécanique (*shear stress, contrainte de cisaillement*) (416), mais également en réponse à la bradykinine, le VEGF, l'histamine, la thrombine, le HDL (*High Density Lipoprotein*), l'adiponectine et l'exercice physique.

L'activation de la eNOS se fait par phosphorylation de Ser633 ou Ser1177 par des kinases comme la PI3K/Akt, AMPK, la PKA et la CaMKII (Figure 37). La phosphorylation est activée par un influx de Ca^{2+} à travers le TPRV1, canal cationique non sélectif perméable au Ca^{2+} (397).

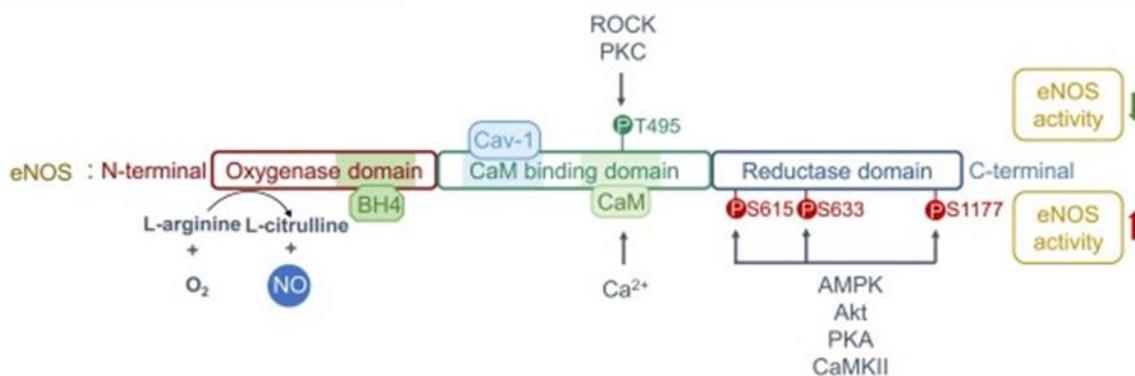


Figure 37 : Structure de la eNOS et sites de régulation de son activité kinase dépendante (417)

A l'inverse, la phosphorylation de Thr495 par la protéine kinase C ou par la voie Rho/ROCK supprime l'activité de la eNOS en interférant avec l'accrochage de la calmoduline à la eNOS (418) (Figure 38).

Les substrats de la synthèse de NO sont la L-arginine, le NADPH, H^+ et l'oxygène. Des cofacteurs sont nécessaires : tétrahydrobioptérine (BH4), flavine adenine dinucléotide, flavine mononucléotide, hème et calmoduline.

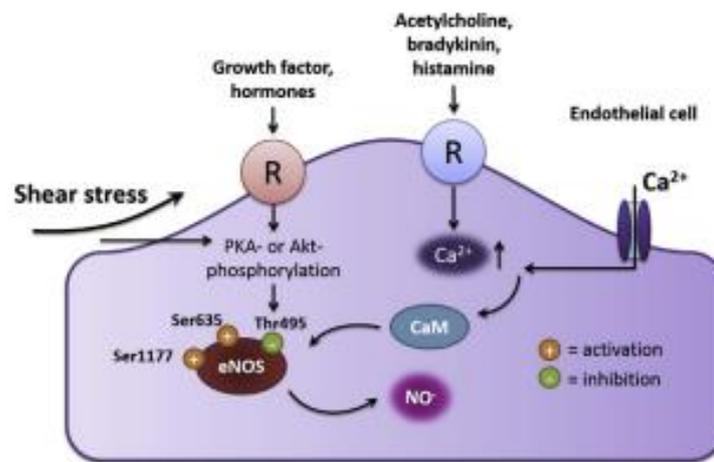


Figure 38 : Activation calcium-dépendante et - indépendante de la eNOS(419). D'une part, les agonistes (comme l'acétylcholine, la bradykinine et l'histamine) agissent sur des récepteurs spécifiques sur la membrane de la cellule endothéliale pour augmenter la concentration intracellulaire en calcium ; le calcium se fixe à la calmoduline (CaM), ce qui entraîne l'activation du domaine de fixation de la calmoduline de la eNOS pour produire de l'oxyde nitrique (NO). D'autre part, la phosphorylation de eNOS indépendante de la quantité de calcium intracellulaire. Thr495 est un site inhibiteur alors que Ser 635 et Ser 1179 sont des sites activateurs : la réponse à la contrainte de cisaillement et aux hormones se fait principalement par cette voie indépendante du calcium.

Il existe 2 modes de fonctionnement pour la eNOS (Figure 39). En mode couplé, la eNOS est sous la forme d'un homodimère actif. Si l'apport en BH4 et/ou en L-arginine est insuffisant, les 2 sous unités oxygénase de l'enzyme fonctionnent indépendamment et produisent simultanément du NO et de l'anion superoxyde. Ces 2 entités réagissent ensemble pour le peroxyde nitrique, un pro oxydant puissant. C'est le mode découplé (122) .

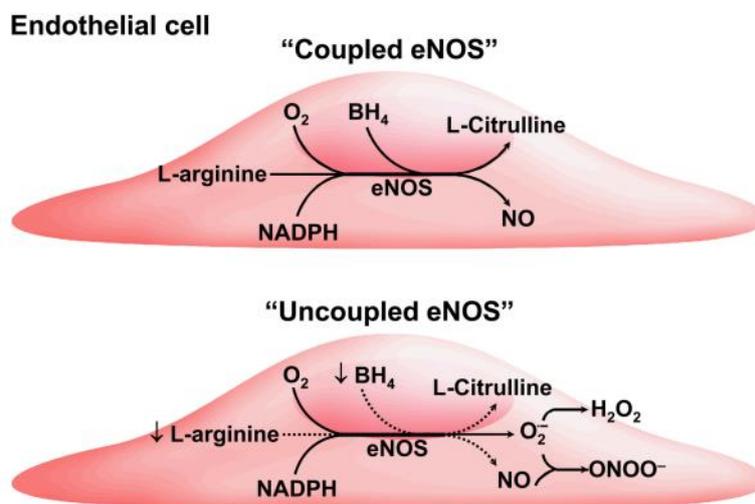


Figure 39 : Découplage de la eNOS (420)

Activités du NO

La libération de NO aboutit à l'activation de la guanylate cyclase soluble et la production de GMPc qui active notamment la PKG (protéine kinase G) (421).

Le NO forme des espèces nitrosées entraînant une modification post traductionnelle des protéines cibles.

Par interaction avec des molécules oxydantes ou réactions auto- oxydatives, le NO peut être transformé en nitrates et nitrites (422). Ils formeraient un réservoir recyclable en NO et autres espèces nitrogénées actives (423).

Vasodilatation

Le NO produit par la eNOS diffuse aux cellules musculaires lisses et induit leur relâchement. L'activation de la PKG par le GMPc entraîne l'expulsion du calcium hors de la cellule. Les kinases ne sont alors plus capables de phosphoryler les chaînes légères de myosine. Les myofilaments se relâchent, entraînant une augmentation du diamètre du vaisseau (424). Un faible niveau de synthèse de NO par les cellules endothéliales est suffisant pour maintenir le tonus vasculaire basal (425).

Anti oxydant

Le NO participe à la balance oxydant/anti oxydant.

D'une part, le NO réagit avec des EROs pour former des espèces réactives de l'azote potentiellement délétères, comme le peroxy-nitrite (ONOO-) (426).

Mais en parallèle, la réaction avec O_2^- empêche la formation du radical hydroxyle, extrêmement réactif et entraînant des dommages cellulaires (427). Le NO empêche également la peroxydation lipidique (428) et la production d'anion superoxyde en inhibant la NADPH oxydase endothéliale (429).

Inhibiteur plaquettaire

Dans les plaquettes, le NO stimule la guanylate cyclase pour augmenter le GMPc et activer la PKG. Cela inhibe l'activation plaquettaire par différentes voies.

La PKG recharge le stock de Ca^{2+} et inhibe le relargage de Ca^{2+} par le reticulum sarcoplasmique, contribuant par ses 2 mécanismes à la réduction du Ca^{2+} intracellulaire (430). Egalement, la PKG phosphoryle le récepteur à la TXA_2 , inhibant sa fonction et donc sa capacité à activer les plaquettes (431).

Le GMPc, lui, augmente de manière indirecte la concentration intracellulaire en AMPc par l'inhibition de la phosphodiesterase 3 (432) puis le cGMP et l'AMPc agissent en synergie pour inhiber l'agrégation plaquettaire.

Le GMPc inhibe aussi la PI3-K, activant le récepteur GPIIb-IIIa à la fibrine (433).

Adhésion cellulaire

Le NO régule l'expression des molécules d'adhérence comme la P-sélectine, V-CAM1 et ICAM-1 par les leucocytes, les plaquettes et les cellules endothéliales (434).

NO et globule rouge

Le GR peut synthétiser du NO, le garder en réserve et le transporter (435).

En conditions hypoxiques, la desoxyhémoglobine synthétise du NO à partir du nitrite par son activité nitrite réductase (436). Il entraîne une vasodilatation compensatrice pour augmenter l'apport en oxygène par augmentation du flux sanguin local (437). De plus, une NOS du même isoforme que la eNOS a été identifiée dans les GRs (438). Elle est activée par le calcium et la phosphorylation de la PI3K, en cas de stress mécanique notamment (439). A partir de L arginine, elle produit du NO qui peut diffuser aux cellules musculaires lisses pour vasodilater (440). Le NO produit à l'intérieur du GR peut également modifier les caractéristiques biophysiques de cette cellule, notamment sa déformabilité (441). Elle serait en lien avec une augmentation de la S-nitrosylation des protéines du cytosquelette (442) via le GMPc (443). Le NO pourrait également moduler la perméabilité potassique et donc l'hydratation du GR (443).

Par ailleurs, le NO peut se lier à l'hémoglobine pour former la S-nitrosohémoglobine. Lors de la desoxygénation, le groupe NO est transféré pour former un S-nitrosothiol qui aurait un pouvoir vasodilatateur (444).

2.2 Les Prostanoïdes

Les eicosanoïdes sont une vaste famille de dérivés d'oxydation d'acides gras polyinsaturés à 20 atomes de carbone rangés en deux types :

- les leucotriènes (LT) ;
- les prostanoïdes, parmi lesquelles :
 - o les prostaglandines (PG),
 - o les thromboxanes (TX),
 - o les prostacyclines (PGI₂).

Dans les cellules endothéliales vasculaires, les prostaglandines G/H synthases (PTGS) produisent principalement des prostaglandines à partir d'acide arachidonique. Il s'agit d'un procédé en 2 étapes

combinant une activité cyclo-oxygénase (COX) et une activité peroxidase, transformant l'AA en prostaglandine H2 (PGH₂).

La COX-1 (ou PTGS1) est exprimée constitutivement dans la plupart des cellules, alors que la COX-2 (ou PTGS2) n'est exprimée qu'en réponse au stress oxydatif ou aux cytokines.

La PGH₂ est ensuite isomérisé par la PGI synthase en PGI₂. La PGI₂ est produite principalement dans les cellules endothéliales et les cellules vasculaires musculaires lisses. Elle a différentes activités pharmacologiques dont l'inhibition plaquettaire, la vasodilatation, l'athéroprotection par l'inhibition de l'adhésion cellulaire et la gastroprotection (445). De plus, la PGI₂ agit en synergie avec la prostaglandine E2 (PGE₂) dans la médiation de la douleur et l'inflammation (446).

Les prostanoides se fixent sur des récepteurs aux prostanoides sur les cellules musculaires lisses vasculaires (Figure 40). L'activation du récepteur à la PGI₂ (récepteur IP) et d'autres récepteurs aux prostanoides (EP2, EP4, DP1), entraîne la relaxation de la cellule musculaire lisse. Les récepteurs EP3C et EP4 participent à la vasodilatation via la libération de CGRP en particulier (446). A l'inverse, l'activation du récepteur EP1 entraîne une vasocontraction.

La PGI₂ active également les PPAR (*peroxisome activated receptors*) et entraîne une vasodilatation via l'activation de la eNOS (447).

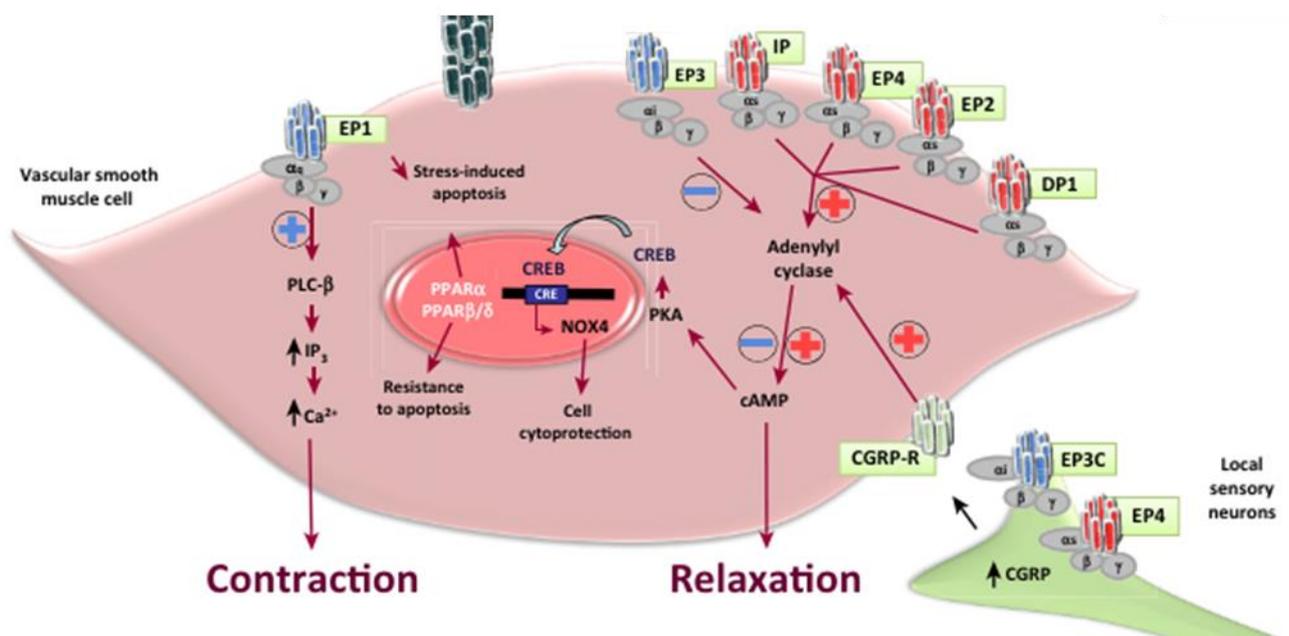


Figure 40 : Les voies des prostanoides (445)

Enfin, la PGI₂ et la PGE₂ ont également un rôle dans l'angiogenèse, via le VEGF et dans la protection cellulaire (448).

2.3 Endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHFs)

Initialement le terme EDHF a été introduit pour décrire les voies vasodilatatrices non associées au NO et aux prostaglandines. Dans les vaisseaux, les EDHFs entraînent l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses vasculaires et la vasodilatation (449).

Deux voies ont été décrites. Dans la voie classique, divers agonistes activent les cellules endothéliales et initient l'hyperpolarisation via des *gap junctions* myo-endothéliales ou via la diffusion de K^+ (450). La seconde voie dépend d'une augmentation du calcium intracellulaire mais ne nécessite pas d'hyperpolarisation de la cellule endothéliale (381).

3. Signal purinergique

L'ATP et ses produits se fixent aux récepteurs purinergiques, initialement nommés P1 et P2 en fonction de leur affinité pour l'adénosine et l'ATP, respectivement (Figure 41).

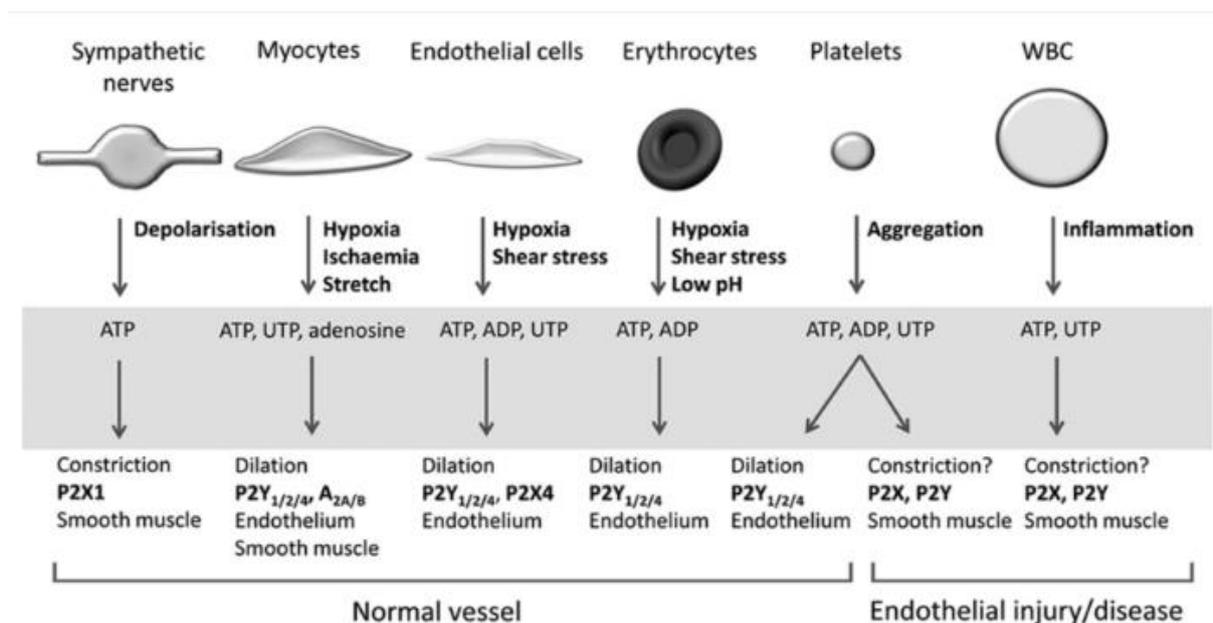


Figure 41. Les sources cellulaires de nucléotides et nucléosides contrôlant la contractilité des vaisseaux sanguins (451).

Dans les vaisseaux sanguins sains, la vasoconstriction par l'ATP libéré par les nerfs sympathiques et la vasodilatation par les purines et pyrimidines libérées par les cellules endothéliales, les myocytes et les GRs agissent ensemble pour réguler le tonus vasculaire. Les plaquettes qui s'agrègent libèrent des nucléotides entraînant une vasodilatation endothélium dépendante.

En cas d'atteinte vasculaire, les plaquettes et les leucocytes adhèrent à l'endothélium dysfonctionnel/lésé et la libération de nucléotides pèse dans la balance en faveur de la vasoconstriction.

Chapitre 5- La cicatrisation

En cas de plaie, l'ensemble du système cutané est perturbé ; différents acteurs vont entrer en jeu successivement pour rétablir l'homéostasie cutanée. Ainsi, lorsque au moins l'épiderme et le derme sont endommagés, la cicatrisation se déroule en quatre phases qui se chevauchent dans le temps : l'hémostase, l'inflammation, la prolifération et le remodelage ; chacune faisant intervenir des types cellulaires spécifiques (Figure 42).

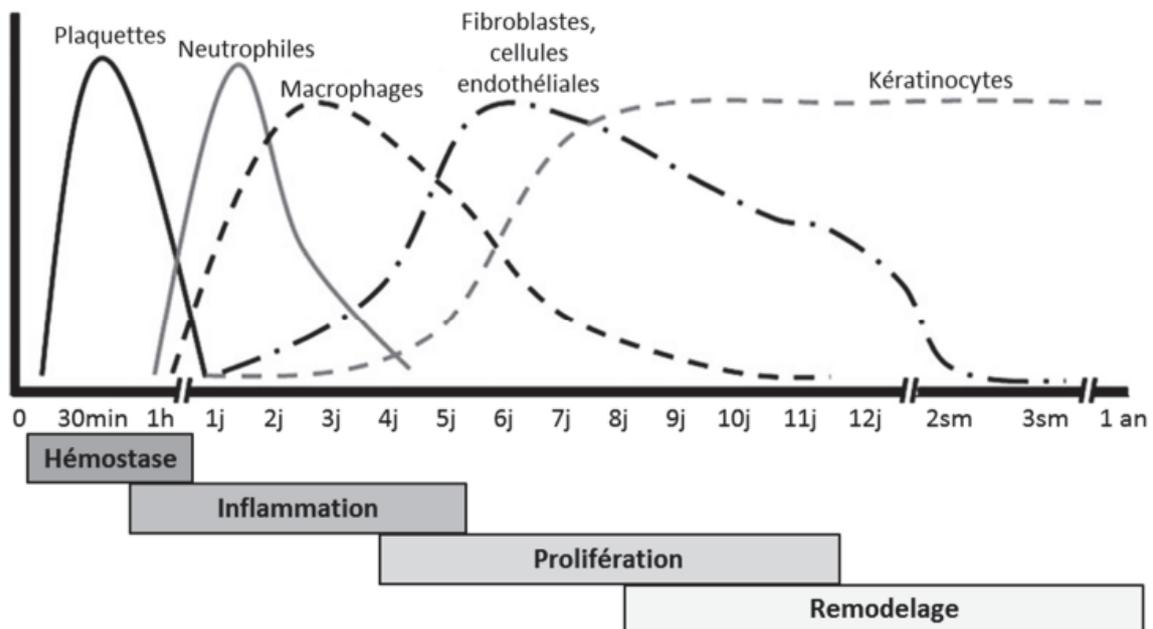


Figure 42 : Les 4 phases de la cicatrisation. En haut, la cinétique des différents types cellulaires impliqués lors de la cicatrisation normale de la plaie. En bas, les 4 phases de cicatrisation. J, jour ; sm, semaines (452).

I. Le processus de cicatrisation normal et l'hémostase

1. L'hémostase

L'hémostase est la première étape du processus de cicatrisation. Elle est activée par une lésion du sous endothélium qui va relarguer du facteur von Willebrand qui va ralentir les plaquettes et mettre à nu le collagène

En condition physiologique, l'hémostase débute par l'hémostase primaire qui a pour objectif d'aboutir à la formation d'un clou plaquettaire. La vasoconstriction, peut diminuer le calibre des micro vaisseaux jusqu'à 40% de la taille initiale par la libération de sérotonine, adrénaline, noradrénaline et TXA2 (453).

Les plaquettes sont des cellules anucléées fournissant un support d'assemblage pour les facteurs de la coagulation activés. L'adhésion plaquettaire au sous endothélium se fait grâce au facteur Von Willebrand qui agit comme un pont entre le collagène du sous endothélium et la surface plaquettaire (454). Après adhésion, les plaquettes secrètent le contenu de leurs vésicules (TXA2, ADP (adénosine diphosphate)/ATP, 5HT (sérotonine)) pour s'auto activer et activer les autres plaquettes. Elles libèrent également du calcium nécessaire à l'assemblage des différents facteurs de la coagulation à sa surface. Cette phase dure quelques secondes.

La propagation de l'activation plaquettaire par le TXA2 entraîne la formation d'un amas de plaquettes. Les plaquettes s'agrègent via le complexe de glycoprotéines IIb/ IIIa et le fibrinogène (454). Cette phase dure quelques minutes. Puis le caillot se rétracte grâce à la GpIIbIIIa qui modifie le cytosquelette.

L'objectif de la *coagulation* est de transformer le fibrinogène en fibrine pour créer un caillot. Elle se fait en 4 étapes (455). Cette phase dure quelques minutes. Elle se déroule à la surface des plaquettes.

- Initiation : Le facteur tissulaire (FT) exprimé par les fibroblastes du sous endothélium (et libéré en cas de brèche vasculaire) ou par les cellules endothéliales activées (synthèse en réponse à l'inflammation) active la voie extrinsèque. Ce FT favorise l'auto activation du FVII en FVIIa. Le complexe FT-FVIIa va générer du FIXa, du FXa et quelques traces de thrombine (FIIa). (Figure 43). Les cofacteurs FVIII et FV sont activés.

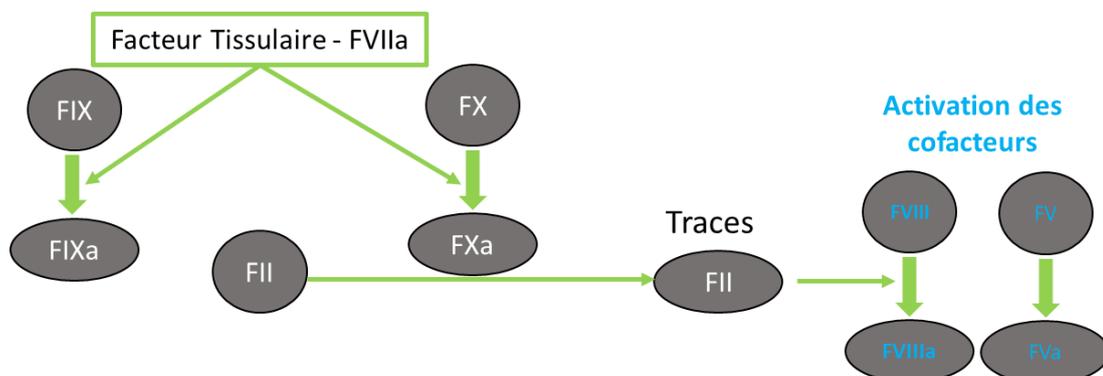


Figure 43 : Concept actuel de la phase d'initiation de la coagulation

- Amplification : Ces traces de thrombine vont activer le FXI en FXIa et les cofacteurs FVIII en FVIIIa et FV en FVa ainsi que les plaquettes. Cette étape multiplie par 1000 la formation de thrombine.
- Propagation : Cette étape va multiplier par 30 000 la formation de thrombine. Le FXIIIa va activer le FIX en FXa pour former le complexe Tenase FIXa-FVIIIa. Celui-ci va activer le FX en FXa pour

former le complexe prothrombinase FXa-FVa qui va alors activer la prothrombine (FII) en thrombine. La thrombine transforme le fibrinogène en fibrine.

- Terminaison : Le FT est inhibé par la formation du complexe TFPI-FT-FVIIa-FXa. L'antithrombine est un inhibiteur de serine protéase ; elle va inactiver le FVIIa, FIXa, FXa et la thrombine. Les cofacteurs FVa et FVIIIa sont inactivés par la protéine C activée. La protéine C est activée par la thrombomoduline (TM), elle-même activée par la thrombine. En présence de calcium, la protéine C activée se fixe sur la membrane plaquettaire. La protéine S, son cofacteur, vient se fixer à côté (453). En dehors de son action plasmatique anticoagulante et pro-fibrinolytique, la protéine C a également des actions cellulaires : stimuler l'expression de gènes anti-inflammatoire et anti-apoptotique, maintenir les jonctions cellulaires entre elles et pro-angiogéniques.

L'activation de *la fibrinolyse* durera quelques minutes puis la lyse du caillot dure quelques heures à quelques jours. Le t-PA (*tissular plasminogen activator*) transforme le plasminogène en plasmine. Celle-ci va dégrader la fibrine en produits de dégradation de la fibrine et a également une activité collagénase (455).

L'hémostase après une plaie vasculaire

La lésion vasculaire expose les protéines de la membrane basale et les macromolécules de la matrice extracellulaire (456). Les récepteurs plaquettaires de surface se fixent au collagène, activent la plaquette qui va produire de la thrombine catalysant, à son tour, l'initiation de la cascade de la coagulation (457). Le fibrinogène va donner naissance à la fibrine, qui, accumulée avec le collagène interstitiel, va piéger les neutrophiles, les globules rouges et les autres composants du sang formant le thrombus (458).

Une matrice extracellulaire provisoire est formée de protofibrilles de fibrine, stabilisée par des liens intermoléculaires par l'action du facteur XIIIa. Cette matrice extracellulaire (MEC) provisoire est utilisée par les fibroblastes et les cellules endothéliales pour migrer et entraîner la contraction de cette MEC provisoire par les protomyofibroblastes (459). Cette MEC provisoire est remodelée par les matrix métalloprotéases (MMPs) relargués par les fibroblastes et les macrophages pour former une nouvelle MEC qui aidera la migration des neutrophiles et monocytes (460). Les plaquettes vont également libérer du TGF- β de leurs granules alpha. Celui-ci agit comme chemoattractant pour le recrutement de différentes cellules immunitaires dont les neutrophiles et les macrophages (461).

L'ensemble des cellules immunitaires participent à la cicatrisation de manière bien coordonnées, autant dans la phase inflammatoire initiale que pendant la résolution pour finaliser la cicatrisation.

2. La phase inflammatoire

2.1. Phase pro-inflammatoire : débridement de la plaie

Les neutrophiles jouent un rôle majeur dans le contrôle des infections (par phagocytose, relargage de substances toxiques et NETose) et dans le débridement de la plaie (production de protéases dégradant la matrice extra cellulaire endommagée).

Quelques minutes après la plaie, leur recrutement est initié par les facteurs de croissance et chemokines relargués par les plaquettes activées dans le thrombus, par des peptides relargués par des bactéries et par les cellules lésées (462) (Figure 44).

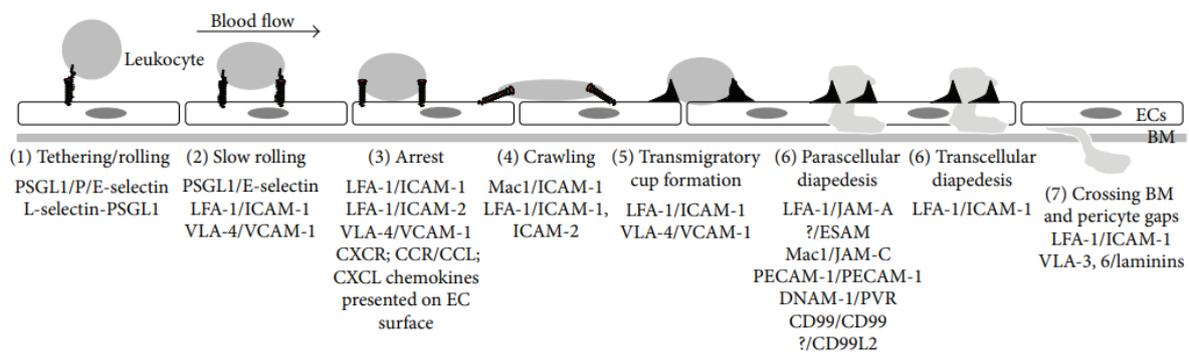


Figure 44 : Protéines régulatrices impliquées dans la séquence de l'interaction adhésive entre cellule endothéliale et leucocytes: (1) adhésion/roulement, (2) roulement lent, (3) arrêt, (4) ramper, (5) formation d'une coupe transmigratoire, (6) diapédèse paracellulaire ou trans cellulaire et (7) traverser la membrane basale et les pericytes (463).

Une fois dans la plaie, les neutrophiles relarguent d'avantage de médiateurs chemoattractants pour poursuivre le recrutement d'autres neutrophiles (464). Au 2^e jour, les neutrophiles sont les cellules immunitaires les plus présentes dans la plaie. Les neutrophiles éliminent les pathogènes par mécanismes intracellulaire (opsonisation et phagocytose) et extracellulaire (relargage de *neutrophils extracellular traps* (NETs)) (465). Via des cytokines, chemokines et facteurs angiogéniques, les neutrophiles activent les cellules résidentes hématopoïétiques, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules B, T et NK pour moduler la réponse de l'immunité innée et adaptative (462).

Les DAMPs et *Pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) entraînent le recrutement des monocytes circulants par les macrophages résidents dans le tissu lésé (466). Les DAMPs sont des molécules dangers endogènes relarguées par des cellules lésées ou mourantes. Les PAMPs sont de petits motifs moléculaires conservés chez les bactéries, non présents chez l'hôte.

Une fois sur place, les monocytes relarguent des chemokines pour recruter des neutrophiles dans la plaie (467) (Figure 45).

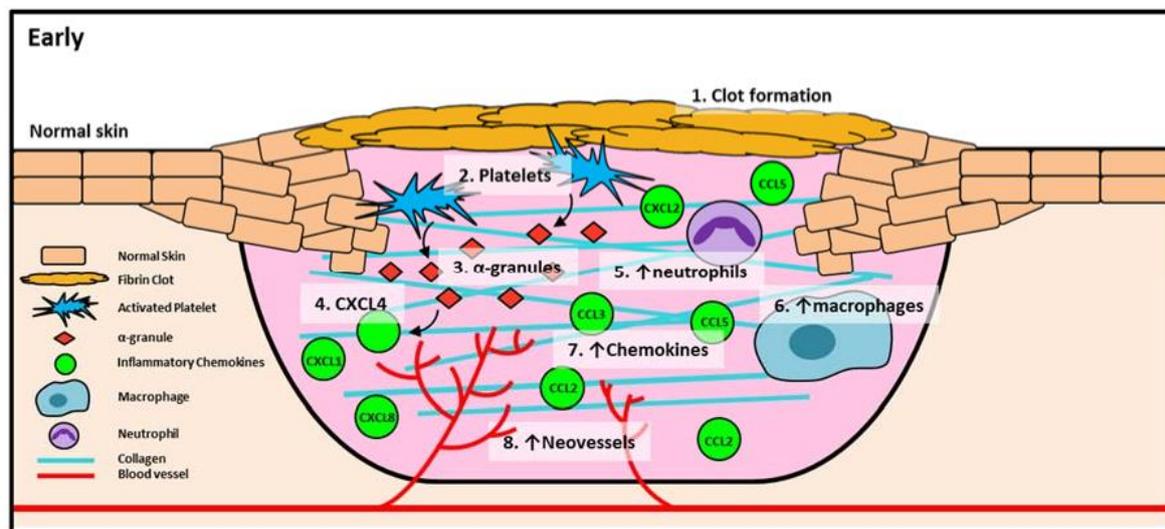


Figure 45 : Phase précoce de la cicatrisation. 1) Formation du thrombus, 2) activation des plaquettes et relargage du contenu des 3) granules α pour libérer le 4) CXCL4, un inhibiteur précoce de l'angiogenèse. Après la formation complète du thrombus, d'autres chemokines contenues dans les granules α (CXCL8, CXCL1 et CXCL2) recrutent des cellules inflammatoires dont 5) les neutrophiles et 6) les macrophages. 7) Les neutrophiles et macrophages libèrent d'autres chemokines comme CCL2, CCL3 et CCL5 dans la plaie pour favoriser le recrutement de davantage de cellules inflammatoires qui relargueront les facteurs pro-angiogéniques pour 8) augmenter la formation de néo vaisseaux. (467)

Le relargage des granules des neutrophiles augmente le recrutement des monocytes qui mûrissent en macrophage (468). La détection des PAMPs et DAMPs par les *pattern recognition receptors* (PPRs) des macrophages, la production d'interféron gamma (INF- γ) et de TNF- α par les cellules de l'immunité innée et adaptative va induire un phénotype inflammatoire (M1) des macrophages qui vont produire des cytokines pro-inflammatoires, des eROS et espèces nitrogénées pour contrôler les pathogènes (469). En conjonction avec les neutrophiles, les macrophages participent au nettoyage des bactéries, des cellules mortes, des neutrophiles apoptotiques, des débris tissulaires et autres matériaux étrangers.

2.2. Phase anti-inflammatoire : stimulation de la prolifération cellulaire

Une fois que la plaie est nettoyée par les macrophages, les neutrophiles collaborent avec les macrophages pour résoudre la phase inflammatoire. D'une part, les neutrophiles relarguent des pro-résolvines (les résolvines, les protectines, les marésines et les lipoxines sont des dérivées de l'acide arachidonique impliquées dans la résolution de l'inflammation) (470). D'autre part, les neutrophiles apoptotiques éfferocytés par les macrophages leur transfèrent des molécules pour orienter leur biosynthèse vers des médiateurs pro-résolvines (471). Les macrophages adoptent différents

phénotypes anti-inflammatoires (472) : les M2a relarguent la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et inhibent la production d'IL-1 β et TNF α (473) et Les macrophages M2b et M2c diminuent les lésions causées par les macrophages M1 (474).

3. La phase proliférative

Lorsque l'inflammation est résolue, la phase proliférative consiste en la refabrication du tissu lésé ; la fibroplasie pour le tissu conjonctif manquant, la réépithélialisation pour la peau, l'angiogénèse pour les vaisseaux et la réparation des nerfs. L'ensemble se déroule en parallèle.

3.1 Fibroplasie

Les fibroblastes sont les cellules clés de la fibroplasie. Ils sont capables de répondre à des signaux extracellulaires tels qu'IL-1, TNF- α , TGF- β , PDGF (*platelet derived growth factor*), EGFR et FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*) relargués par les plaquettes, les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les kératinocytes (475,476), pour qu'ils prolifèrent et modulent la production de métallo protéinases et inhibiteurs de métallo protéinases (477).

Dans un premier temps, il se forme un tissu de granulation correspondant à une matrice riche en fibrine constituée de fibrinogène, fibronectine, protéoglycanes et plaquettes en contact avec le collagène de la matrice extracellulaire.

Ensuite, les fibroblastes migrent dans ce tissu de granulation pour initier la synthèse de collagène afin de remplacer la matrice provisoire riche en fibrine par une matrice riche en collagène. Les fibroblastes se différencient alors en myofibroblastes pour augmenter le dépôt de collagène et débiter la contraction de la plaie (460).

3.2 Réépithélialisation

La cellule clé de cette étape est le kératinocyte. Ils proviennent à la fois d'une prolifération des berges de la plaie mais migrent également à travers la matrice provisoire sous l'effet de différents facteurs (interactions entre cellules et cellules-matrice extracellulaire, les facteurs de croissance et les cytokines) (478). Le cycle s'auto-entraîne puisque les kératinocytes stimulent les fibroblastes pour qu'ils relarguent des facteurs de croissance qui vont à leur tour stimuler les kératinocytes (479).

3.3 Angiogenèse

La plaie est responsable de lésions vasculaires plus ou moins sévères diminuant l'apport sanguin local. En parallèle, la réparation de la blessure va entraîner une accélération du métabolisme cellulaire et donc une augmentation des besoins en oxygène. Ces 2 phénomènes vont entraîner une hypoxie locale, stimulus majeur de l'angiogénèse.

Les macrophages, fibroblastes, cellules vasculaires endothéliales et les kératinocytes vont alors synthétiser l'*hypoxia inducible factor-1* (HIF-1) (480). La néo-vascularisation est initiée par le relargage de facteurs pro-angiogéniques dont principalement le VEGF qui entraîne la modification du métabolisme des cellules endothéliales vers 3 types de cellules spécialisées, qui combinées ensemble, sont capables d'angiogenèse (400) (Figure 46).

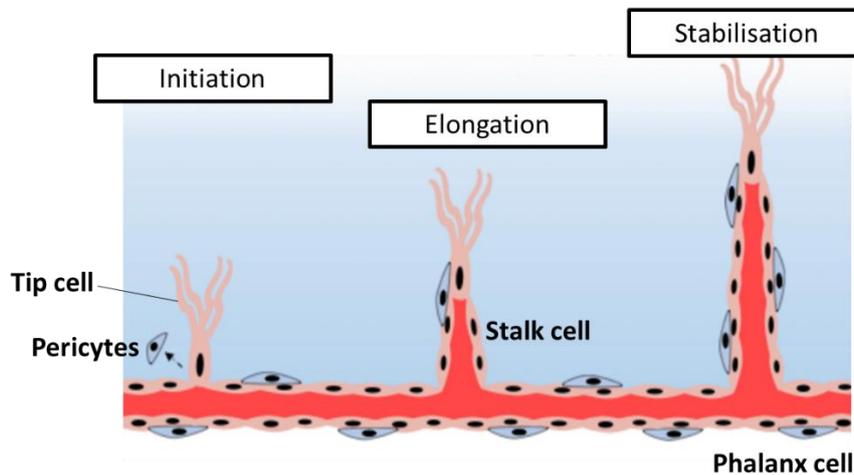


Figure 46: Les 3 phases de la néo-angiogenèse. A l'état basal, les cellules endothéliales quiescentes forment une monocouche cellulaires entourées par des péricytes qui suppriment l'activation des cellules endothéliales et stabilise le vaisseau. Pendant l'angiogenèse, une unique cellule de pointe (*tip cell*) est attirée par le signal d'hypoxie. Cette cellule de pointe détruit la lame basale et migre dans la matrice extra cellulaire. La cellule de pointe possède des filopodes et est caractérisée par une faible capacité de prolifération mais une grande capacité migratoire et sa capacité à recruter des cellules non vasculaires. Les cellules de tige (*stalk cell*), à grande capacité proliférative, suivent la cellule de pointe forment une lumière vasculaire et assurent l'élongation du vaisseau. Une nouvelle boucle vasculaire est enfin formée lorsque 2 moignons vasculaires se rejoignent, formant une anastomose. Les cellules de phalange (*phalanx cell*) stabilisent le vaisseau néoformé (481).

Cette structure acquière une membrane basale et les cellules endothéliales relarguent du PDGF pour recruter les péricytes (482). Pour finir, les fibroblastes synthétisent et déposent une matrice extracellulaire supportant les cellules et les nouveaux vaisseaux sanguins (483).

3.4 Réinnervation

Les nerfs périphériques sont lésés au site de la plaie, altérant la fonction neurologique. Chez l'adulte, le système nerveux périphérique est capable de régénérer la fonction nerveuse en faisant grandir les 2 extrémités de nerf sectionnés myélinisés pour les reconnecter (484).

Dans un premier temps, la dégénération wallérienne se met en place avec dégénération axonale, dégradation de la myéline et prolifération des cellules gliales de support. Ensuite, les cellules de

Schwann ont une plasticité importante ; elles peuvent se différencier en cellule progéniteur-like après une lésion nerveuse pour ré-étendre l'axone (485).

4. Phase de remodelage

Il s'agit de la dernière phase devant aboutir à la formation d'une nouvelle barrière cutanée. Durant cette phase, le tissu de granulation (matrice extracellulaire riche en fibrine) disparaît progressivement. L'épiderme, la vascularisation du derme, les nerfs et les fibres des muscles squelettiques sont remodelés pour former un tissu fonctionnel. Le taux de fibroblastes et myofibroblastes diminue. Les cellules mononucléées du sang meurent par apoptose ou quittent la plaie. Les métalloprotéases relarguées par les fibroblastes et les macrophages dégradent le collagène de type III qui formait le tissu de granulation et le remplacent par du collagène de type I, qui est réorganisé en fibrilles parallèles, formant une cicatrice pauvre en cellule. Cette phase peut durer plusieurs mois (486).

5. Le rôle des neuromédiateurs dans la cicatrisation

Outre les chimiokines, facteurs de croissance et enzymes cités dans la partie précédente, il est maintenant reconnu que de nombreux neuromédiateurs sont sécrétés au niveau de la peau et ont une action sur l'homéostasie cutanée et la cicatrisation. Ces molécules peuvent être synthétisées par les fibres nerveuses, mais également les cellules cutanées et les cellules immunitaires

5.1 Les neurotransmetteurs

L'acétylcholine et les catécholamines entrent dans cette catégorie. Ce sont des médiateurs sécrétés par les fibres nerveuses autonomes et par des cellules non neuronales, jouant un rôle dans l'homéostasie et l'inflammation cutanée. En effet, une faible dose d'acétylcholine accélère la cicatrisation cutanée en favorisant la migration des kératinocytes et l'angiogenèse (487). La stimulation des récepteurs α -adrénergiques par les catécholamines augmente la production de TGF- β par les fibroblastes, favorise leur migration et la production de MEC (488). A l'inverse, le blocage des récepteurs β -adrénergiques par les catécholamines accélère la migration des kératinocytes et la ré-épithélialisation des plaies (489).

5.2 Les neuropeptides

Le système nerveux périphérique est parmi les premiers à répondre à la lésion cutanée via la douleur. Cela entraîne la libération de substance P et CGRP (490). Ces neuropeptides ont 3 cibles : la CGRP entraîne une vasodilatation pour augmenter l'afflux sanguin, la SP favorise la perméabilité vasculaire pour recruter les cellules inflammatoires et stimule la dégranulation des cellules mastocytaires pour

libérer l'histamine, la sérotonine, des protéases et autres médiateurs pour renforcer la perméabilité micro vasculaire et faciliter l'extravasation de fibrine et d'autres facteurs plasmatiques servants de chemo attractants dans la plaie pour les cellules inflammatoires (491,492). La libération de l'histamine par les cellules mastocytaires entraîne une nouvelle libération de SP et CGRP par les terminaisons nerveuses, ce qui renforce la boucle (493).

III. Des acteurs clé de la cicatrisation

Nous allons focaliser sur certains acteurs clés de la cicatrisation cités précédemment que nous avons choisi d'étudier chez les patients inclus dans l'étude, car la concentration plasmatique était modifiée chez les patients avec retard de cicatrisation dans des plaies non drépanocytaires (494).

1. *Vascular Endothelial Growth Factor-A*

La famille VEGF est constituée de nombreux facteurs de croissance, parmi lesquels VEGF-A et VEGF-C sont principalement impliqués dans la cicatrisation (495). Le VEGF-A est produit par les cellules endothéliales, les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les plaquettes, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages (496). L'expression du VEGF-A peut être initiée par d'autres facteurs de croissance (TGF- β 1, EGF, TGF- α , KGF, bFGF et PDGF-BB).

Il s'accroche au *VEGF receptor 1* et au *VEGF receptor 2* sur la surface endothéliale des vaisseaux sanguins (496). Via l'action sur ses récepteurs, le VEGF-A favorise la prolifération endothéliale, la différenciation et la régulation de la perméabilité vasculaire (497). Le VEGF favorise l'angiogenèse pour restaurer la perfusion tissulaire, remettre en place la microcirculation et augmenter la tension en oxygène dans la plaie (498).

2. *Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α)*

Le TNF- α est une cytokine ubiquitaire pro inflammatoire produite par les monocytes/macrophages en cas d'inflammation aigue (499). La plupart des cellules de l'organisme possède des récepteurs au TNF- α , expliquant ses multiples actions directes ou indirectes.

Dans la cicatrisation physiologique, les taux les plus élevés de TNF- α sont observés pendant les 12 à 24 premières heures (500). Le TNF- α revient à un taux de base après la phase proliférative. Initialement, il est principalement exprimé par les leucocytes puis par les macrophages. La production de TNF- α participe au phénotype inflammatoire des macrophages (M1). (501).

Plus tardivement, il est aussi exprimé sur les berges de la plaie là où l'épithélium prolifère. Le TNF- α contribue à la stimulation des fibroblastes et des kératinocytes, à l'expression des facteurs de croissance et à la régulation des défenses anti microbiennes (502).

Toutefois, de nombreuses études ont recherché un retard de cicatrisation post-opératoires chez les patients traités par anti TNF- α pour des pathologies inflammatoires et ces résultats sont peu probants (503). En Jamaïque, Bowers et al. ont comparé la concentration plasmatique de TNF- α chez les patients drépanocytaires en fonction du statut ulcère (31 patients HbSS sans ulcère et 24 patients HbSS avec ulcère actif) ; ils n'avaient pas montré de différence (270).

3. Les Interleukines

3.1 Interleukine 1

La famille des cytokines IL-1 comprend 11 cytokines qui modulent la réponse immunitaire. Elle agit principalement sur les leucocytes et les cellules endothéliales (504). IL-1 α et IL-1 β sont les 2 agonistes majeurs qui déclenchent l'inflammation via la transcription de gènes inflammatoires.

L'IL-1 α est exprimée de manière constitutive. L'IL-1 α agit comme un régulateur de la transcription dans le noyau et affecte l'inflammation et l'immunité en dehors de la cellule. L'IL-1 α a un rôle de signal d'alarme pour initier l'inflammation en réponse à une lésion tissulaire. (505).

A l'inverse, l'IL-1 β n'est pas exprimé en conditions homéostatiques normales; il s'active après clivage de son précurseur par la caspase-1 de l'inflammasome (506).

Il a été démontré qu'un taux d'IL-1- β au-dessus de la normale est associé aux plaies qui ne cicatrisent pas (507). Sur un modèle murin diabétique, bloquer l'IL-1 β a permis de passer du phénotype M1 des macrophages au phénotype M2 (508), augmenter la synthèse de facteurs de croissance et améliorer la cicatrisation.

3.2 Interleukine 6 (IL-6)

L'interleukine 6 est une cytokine connue principalement pour son effet pro-inflammatoire. Toutefois, pendant la réponse aiguë, une des fonctions de l'IL-6 est de diminuer le niveau des cytokines pro inflammatoires sans toucher aux cytokines anti inflammatoires (509). De plus, l'IL-6 stimule la production de l'antagoniste au récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra), qui est un médiateur anti inflammatoire (510). Elle est produite par la quasi-totalité des cellules et des tissus de l'organisme, en réponse à une large variété de stimuli. Elle fonctionne en se fixant à son récepteur membranaire ou soluble.

Les taux d'IL-6 sont élevés pendant les phases inflammatoire et proliférative de la cicatrisation, et retournent à la normale pendant le remodelage (511). Pendant la phase inflammatoire, l'IL-6 est impliquée dans la progression vers la phase proliférative. Pour cela, elle favorise la différenciation lymphocytaires, l'infiltration des monocytes et favorise le switch des macrophages de M1 à M2. Pendant la phase proliférative, l'IL-6 est impliquée dans la croissance et la migration des kératinocytes, la production de collagène et la néo vascularisation.

Une augmentation excessive et prolongée du taux d'IL-6 est corrélée au retard de cicatrisation d'une plaie (512) en induisant une hyper inflammation médiée par les neutrophiles.

3.3 Interleukine 8 (IL-8)

L'interleukine 8 est aussi connue sous le nom de *neutrophil activating peptide*, CXCL8, *small inducible cytokine subfamily B* (SCY88) et *granulocyte chemotactic protein-1* (GCP-1). Il s'agit d'une chemokine synthétisée par de nombreuses cellules de la peau : kératinocytes, fibroblastes et neutrophiles (513). Elle a un rôle important dans la cicatrisation.

Dans la phase inflammatoire, elle est impliquée dans le recrutement et l'activation des leucocytes, particulièrement les neutrophiles (514).

Dans la phase proliférative, il a été démontré un effet sur la migration des kératinocytes ainsi que celle des fibroblastes et des cellules endothéliales (515). Chez la souris sans récepteur à l'interleukine 8, il y a été observé un retard de cicatrisation (516). In vivo, l'interleukine 8 lance la ré épithélialisation (513).

Il a été suggéré que l'interleukine 8 est un marqueur pronostique de cicatrisation des plaies chroniques (515).

3.4 Interleukine 10

L'interleukine 10 est produite par de nombreuses cellules des immunités innée et adaptative, régulant les cellules inflammatoires.

Il a été montré que l'interleukine 10 intervient dans la régulation du phénotype des macrophages et de cytokines pro-fibrotiques comme le TGF- β (517).

Chez le fœtus, la cicatrisation se fait sans cicatrice et l'interleukine 10 tiendrait un rôle clé dans ce phénomène (518). De plus, en post natal, l'hyper expression de l'interleukine 10 chez la souris permet d'accélérer la cicatrisation (519). Cela passerait par la fabrication d'une matrice pericellulaire du haut poids moléculaire riche en hyaluronane. A l'inverse, la souris sans interleukine 10 avait un infiltrat inflammatoire plus important dans la plaie et une cicatrice plus importante (520).

3.5 Interleukine 15

L'interleukine 15 est initialement connue pour son rôle sur les lymphocytes (521), qui sont impliqués dans la cicatrisation, comme nous l'avons vu précédemment.

L'interleukine 15 a également un effet sur les kératinocytes, sur leur prolifération de façon ERK (*extra cellular signal-regulated kinase*) et AKT dépendante (522) et par un effet anti apoptotique (523). Une accélération de la cicatrisation a été observée chez des souris transgéniques surexprimant l'IL-15 (524) qui passerait par le TGF- β .

3.6 Les matrix métalloprotéases (MMPs)

Ce sont des enzymes protéolytiques dégradant le MEC (525). Leur effet est balancé par les TIMPS (inhibiteurs tissulaires des matrix métalloprotéases).

Pendant la cicatrisation « normale », les MMPs ont un rôle important. Elles sont impliquées dans chaque étape de la cicatrisation : retirer les protéines altérées, dégrader la matrice temporaire, participer au recrutement cellulaire, restructurer le tissu de granulation et réguler l'angiogenèse et l'expression des facteurs de croissance (526). Elles sont libérées par les cellules inflammatoires pendant la phase inflammatoire, les cellules endothéliales en réponse aux facteurs de croissance, les kératinocytes migrants puis les myofibroblastes pendant la phase de remodelage (527). En quantité trop importante ou au mauvais moment, les MMPs peuvent ralentir la cicatrisation en détruisant des protéines essentielles à la cicatrisation (MEC et facteurs de croissance) (528).

Les MMPs 1 et 8 sont des collagénases. Les deux ont été trouvées trop présentes dans des ulcères diabétiques par rapport aux plaies aiguës (529). Le ratio MMP-1/TIMP-1 prédit la cicatrisation des plaies diabétiques (530). Toutefois, le traitement de plaies diabétiques par des inhibiteurs de la MMP-8 ralentit la cicatrisation (531).

La MMP-3 est aussi appelée stromelysine-1. Elle régule l'activité collagénolytique et le remodelage de la plaie. Un déficit en MMP-3 entraîne une incapacité des fibroblastes à contracter la plaie et l'application topique de MMP-3 favorise l'angiogenèse (532). La MMP-3 est un activateur de la MMP-9.

La MMP-9 est aussi appelée gélatinase B. Son taux est plus élevé dans les ulcères diabétiques et non diabétiques (533). La MMP-9, à taux élevé, détruit le VEGF (534).

4. La voie MAPK/ERK

La cascade de la MAPK (*mitogen activated protein kinase*) est une voie clé impliquée dans la régulation de la migration, de la prolifération, de la survie et de la différenciation cellulaire. ERK est activé par les Raf serine/thréonine kinases via l'activation de la MEK (*MAPK/ERK kinase*) (535)

Dans la peau, il a été montré que la voie ERK/MAPK est activée en cas de lésion cutanée. In vitro, l'activation de ERK a un effet sur la migration des kératinocytes. A l'inverse, le blocage de cette voie réduit la migration cellulaire et la prolifération altérant la réparation cutanée (536).

II. Exemples d'anomalies de la cicatrisation

Chez un individu sain, la restauration structurelle et fonctionnelle de l'épidermique est très efficace ; alors que la réparation du derme est moins parfaite et peut entraîner la formation d'une cicatrice avec perte partielle de sa structure et de sa fonction. Lorsque la cicatrisation normale échoue, cela peut entraîner une formation excessive du tissu cicatriciel (cicatrice hypertrophique ou chéloïde) ou à l'inverse un défaut de cicatrisation conduisant à une ulcération cutanée chronique (537). Connaître la physiopathologie des autres plaies chroniques permet de rechercher des mécanismes communs, afin de pouvoir appliquer les mêmes principes de traitement lorsque les mécanismes sont communs ou proches.

1. Ulcères veineux

Les ulcères veineux touchent 5% des plus de 65 ans.

La physiopathologie des ulcères veineux repose sur le reflux et/ou l'obstruction veineuse (538).

L'hyperpression veineuse augmente la contrainte de cisaillement du sang sur les cellules endothéliales de la microcirculation et donc sur le glycocalyx à leur surface. Cela est responsable d'une diminution de la production de NO, du relargage des substances vaso actives et l'expression de *macrophage chemoattractant protein-1*, VCAM-1, L-sélectine, E-sélectine et ICAM-1. Il s'en suit le recrutement de leucocytes qui vont transmigrer à travers l'endothélium et lancer la cascade inflammatoire et la production de différentes cytokines dont TGF- β 1, TNF- α , IL-1 et l'augmentation de l'expression des MMPs.

Dans un premier temps, ces mécanismes vont avoir un effet délétère sur les parois veineuses et les valves ce qui va encore d'avantage aggraver l'hyperpression veineuse. A un stade plus avancé, l'inflammation va atteindre les tissus environnants ce qui entraîne une destruction du derme pouvant aller jusqu'à la formation d'un ulcère (539).

Une fois l'ulcère formé, il a été montré que l'augmentation de l'expression des MMPs est associée à un mauvais pronostic de cicatrisation (540). Les MMPs dégradent la matrice provisoire et diminuent l'expression de l'inhibiteur tissulaire de MMPs (TIMP- *tissue inhibitors of MMP*).

Il a été démontré que la composition en cytokines de l'exsudat de la plaie est associée à son évolution (Figure 47).

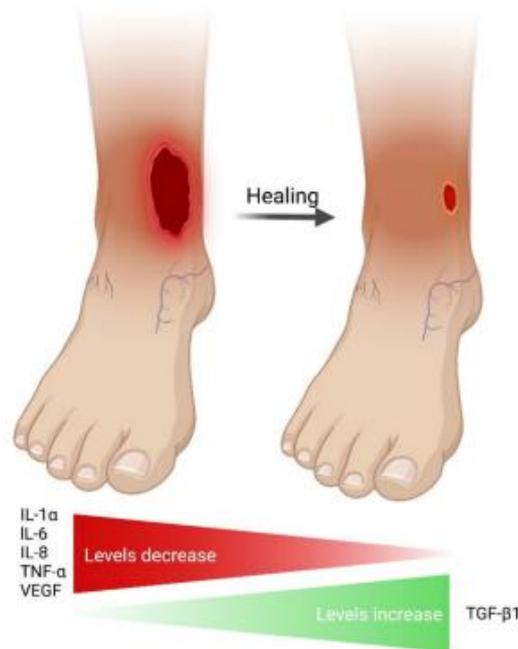


Figure 47. Cytokines élevées dans au moins 3 études sur les exsudats de plaie, biopsies cutanées et échantillons sanguins (541). Une revue de la littérature de l'ensemble des études ayant analysé les cytokines a montré une augmentation significative ($p < 0.10$) de IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α et VEGF en cas d'ulcère ne cicatrisant pas, puis leur concentration diminua avec la mise en place de la compression (au bout de 4 semaines) et la cicatrisation (494). A l'inverse, les ulcères cicatrisants ont un taux de TGF- β 1 plus élevé dans l'exsudat, démontrant son rôle dans la fibroplasie le dépôt de la matrice et la prolifération.

La compression veineuse est le traitement le plus utilisé avec une efficacité démontrée (542). L'application de la compression permet d'augmenter la pression interstitielle, diminuer la pression veineuse hydrostatique dans les systèmes veineux profonds et superficiels ; cela entraîne une réduction de l'hypertension veineuse permettant la cicatrisation.

2. Plaie du pied diabétique

Toutes les cellules ne sont pas sensibles dans la même mesure à l'hyperglycémie. La cellule endothéliale vasculaire n'est pas capable d'augmenter son transport intracellulaire de glucose en réponse à l'hyperglycémie, entraînant donc une hyperglycémie intracellulaire (543).

Dans ces cellules endothéliales, le glucose doit donc utiliser d'autres voies de la glycolyse, ce qui va entraîner une production mitochondriale d'anion superoxyde (544). Les espèces réactives de l'oxygène activent la *Protéine Kinase C* (PKC) (545) et inactivent la eNOS et la prostacycline synthase (2 enzymes anti athérosclérotiques) (546).

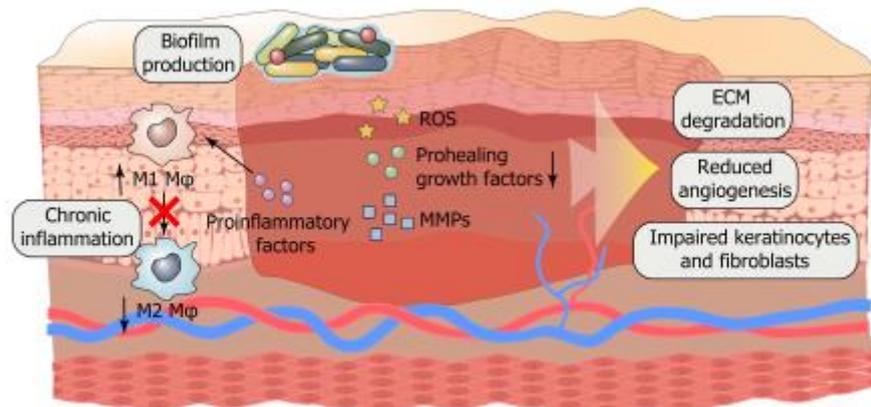
Le stress oxydant altère l'angiogenèse en réponse à l'ischémie (547), active des voies pro-inflammatoires et entraîne des changements épigénétiques en faveur de l'expression persistante de gènes pro-inflammatoires, y compris après normalisation de la glycémie (548).

Le diabète entraîne alors des complications macro vasculaires (artériopathie oblitérante des membres inférieurs, AOMI) et micro vasculaires, entraînant une réduction de la densité capillaire (549). Il a été observé une altération de la vasodilatation mesurée par laser doppler lors de stimulation par la chaleur, acétylcholine et nitroprussiate de sodium au niveau de l'avant-bras de patients diabétiques avec neuropathie sensorielle et avec neuropathie ischémique (n=65), par rapport aux diabétiques sans complications et des individus contrôles (n=63) (550).

La neuropathie périphérique favorise la plaie, du fait de la déformation des pieds créant des zones d'hyper frottement. L'hyperglycémie, en induisant un stress oxydant dans les neurones, entraîne l'activation de différentes voies dont le signal de la PKC, la voie MAPK, le signal NF- κ B, le signal TNF- α , la voie COX, des interleukines, la voie des lipoxygénases... (551). Ces différentes voies entravent la fonction métabolique et créent des lésions nerveuses.

Plusieurs facteurs concourent ensuite au retard de cicatrisation (Figure 48).

Alors que l'hypoxie devrait déclencher HIF-1, celui-ci est inhibé par l'hyperglycémie chez le patient diabétique, ce qui ralentit la cicatrisation (552). L'innervation cutanée, impliquée dans les différentes étapes de la cicatrisation, est altérée et retarde la cicatrisation (553).



DOI: 10.4239/wjcd.v14.i4.364 Copyright ©The Author(s) 2023.

Figure 48 : Mécanismes impliqués dans la plaie diabétique (496). L'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie entraînent la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) et une inflammation chronique (blocage des macrophages au phénotype pro inflammatoire M1). Ceci altère l'angiogenèse. Les facteurs favorisant la cicatrisation sont moins libérés (comme VEGF et PDGF) à l'inverse des matrix métalloprotéinases (MMPs) qui vont dégrader la matrice extra cellulaire (ECM). Les fonctions des fibroblastes sont altérées (dont le dépôt de la matrice extra cellulaire). La prolifération et la migration des fibroblastes est réduite. Un biofilm sur la plaie retarde d'avantage la cicatrisation.

De plus, l'hyperglycémie fait le lit de l'infection bactérienne et les bactéries favorisent le relargage de cytokines pro inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-6) rallongeant la phase inflammatoire (554–556) et retardant la cicatrisation (557). Les macrophages M1 dominant et perpétuent l'inflammation (558). L'inflammation favorise la synthèse des protéases par les neutrophiles, détruisant l'environnement de la plaie, et limite la production de VEGF et donc l'angiogenèse (559).

Partie 2 : Travaux de recherche

Objectifs

Comme pour d'autres complications de la drépanocytose, tous les patients ne sont pas touchés. L'ulcère de jambe touche entre 1 et 30 % des patients drépanocytaires en fonction des cohortes. Diverses études ont montré une hémolyse chronique plus importante, un stress oxydant exacerbé et une diminution de la biodisponibilité du NO importante semblant majorer la dysfonction vasculaire chez le drépanocytaire. Cette atteinte vasculaire responsable d'une ischémie locale a été montrée en analyse anatomo-pathologique chez le patient drépanocytaire avec ulcère de jambe. En revanche, la fonction micro vasculaire de la peau n'a jamais été étudiée chez les patients drépanocytaires avec ulcères de jambe.

Le 1er objectif de cette thèse était donc d'étudier la fonctionnalité du compartiment micro vasculaire cutané. Nous avons analysé sa capacité fonctionnelle à vasodilater, en mesurant les réponses vasculaires par laser doppler fluxmétrie à divers stimuli et sa capacité à transporter de l'oxygène, en mesurant la pression transcutanée en oxygène.

Le 2^e objectif était de ré-explore les associations biologiques connues avec les ulcères de jambe (niveau d'hémolyse et modification de la rhéologie) puis nous avons étendu à d'autres marqueurs (inflammatoires [cytokines (IL-1 α , IL-6, IL-8 et TNF- α) du plasma et de l'exsudat], de cicatrisation [facteurs de croissance (VEGF), matrix metalloprotéases et inhibiteurs de métalloprotéases] et de coagulation globale avec le ROTEM).

Comme le plasma contient des molécules inflammatoires et du stress oxydatif connus pour causer des dommages à l'endothélium, **le 3^e objectif de cette thèse** était de décrire le contenu du plasma et de l'exsudat des patients en fonction de la présence ou non d'un ulcère, puis, de tester l'effet d'une culture de cellules endothéliales en présence de plasma de patients sur l'activation cellulaire et les voies de signalisation de la vasodilatation (COX et eNOS).

Les plaies des patients drépanocytaires ont un délai allongé de cicatrisation. Ces délais de cicatrisation sont très variables d'un patient à l'autre. Aucune étude n'a jamais étudié les patients drépanocytaires avec ulcère de manière longitudinale et après cicatrisation.

Pour augmenter le niveau de preuve sur l'association entre la fonction vasculaire et les ulcères de jambe, **le 4^e objectif de cette thèse** était d'explorer la fonction vasculaire après cicatrisation.

Nous présenterons tout d'abord les méthodes utilisées afin de réaliser les analyses lors de ces études, puis un résumé de celles-ci sera exposé, suivi des articles publiés et en cours de publication.

I. Méthodologie

Patients

En se référant aux données micro circulatoires déjà observées chez les patients drépanocytaires avec et sans complications vaso occlusives (166,560,561), un minimum de 6 patients par groupe était nécessaire (avec et sans ulcère) (risque alpha à 0,05, puissance de 90%, test bilatéral).

La prévalence des ulcères de jambe est rapportée actuellement entre 1,4 % au Brésil et 29,5% en Jamaïque (246–250). En prenant une incidence de 10% pour la cohorte lyonnaise des patients drépanocytaires suivie aux HCL, nous avons prévu d'inclure 70 patients dont 7 au minimum avec ulcères dans notre étude (Drepano2, ID-RCB 2021-A01605-36, CPP 21.01840.000018, ANSM HPSAEC1-2021-07-0012, autorisée par le CPP SUD-EST IV le 12 novembre 2021). Pour être inclus, les patients devaient être de génotype SS ou S β^0 afin de ne pas avoir d'HbA, ce qui correspond aux patients drépanocytaires avec le plus grand risque d'ulcère de jambe (251). Considérant que l'HbA apportée par la transfusion fait varier les paramètres de rhéologie sanguine et d'hémolyse, il s'agissait d'un critère d'exclusion. Toutefois, en raison du faible nombre de patients drépanocytaires avec ulcère actif ou antécédent d'ulcère et comme les ulcères de jambe étaient parfois traités spécifiquement par les transfusions, ces patients ont été inclus ainsi que quelques patients sans plaie transfusés comme contrôle. Pour la même raison biologique, les patients n'étaient pas incluables dans le mois suivant une crise vaso occlusive ou un syndrome thoracique aiguë. Cependant un patient inclus a consulté le même jour aux urgences pour priapisme ; il a donc été exclu des analyses.

Les critères habituels ont également été appliqués. Pour participer les patients devaient être majeurs, accepter de participer à l'étude et signer un consentement éclairé et être affilié à un régime de sécurité sociale ou bénéficiaire d'un tel régime. Etaient non incluables : les majeurs protégés sous tutelle et sous curatelle ainsi que les femmes enceintes et allaitantes.

Dans notre étude DrepanO2, 70 patients ont donc été inclus et 65 patients ont été gardés pour analyses dont 9 patients avec ulcère actif (LU+). Le premier patient a pu être inclus en février 2021 et la dernière visite de suivi a eu lieu en septembre 2023. Il a été très compliqué de faire le suivi à 6 mois en raison des crises douloureuses et transfusions intercurrentes. Cependant, nous avons réussi à suivre 8 patients sur les 9 patients LU+ (Figure 49).

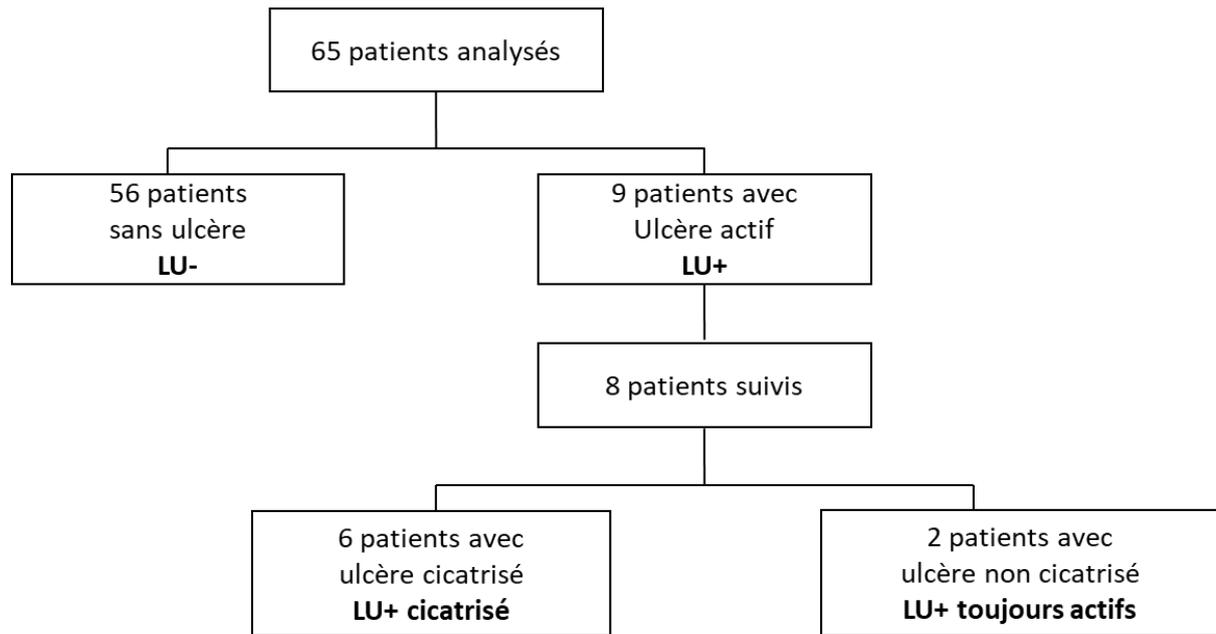


Figure 49 : Diagramme de flux des patients inclus

Prélèvement sanguin

1. Hématologie

1.1 Formule sanguine

Il était réalisé une numération de formule sanguine et un dosage des réticulocytes sur un tube EDTA (Sysmex XN-3000). Les analyses ont été effectuées au sein du laboratoire partenaire au Centre de Biologie Est des HCL.

1.2 Coagulation

L'analyse des marqueurs de la coagulation a été effectuée via un prélèvement veineux, sur 2 tubes citratés. Etaient analysés à partir de ce prélèvement des marqueurs de la coagulation et de l'activité fibrinolytique : Ddimères, le temps de quick, le taux de fibrinogène, le temps de céphaline activé (TCA), les protéines C et S ainsi que le ROTEM (thromboélastométrie rotative).

La thromboélastométrie (Figure 50) a été réalisée selon les recommandations des fabricant du *ROTEM Delta device* (Werfen, Le-Pré-Saint-Gervais, France). Il permet d'étudier les propriétés élastiques et visqueuses du sang total en temps réel, pendant les différentes phases de la coagulation (formation du caillot et lyse) (Figure 51). Il intègre les propriétés des plaquettes, des leucocytes et des GRs dans l'étude de l'hémostase globale (contrairement aux tests standards de coagulation qui étudient les facteurs de coagulation de façon isolée sur plasma pauvre en plaquettes).

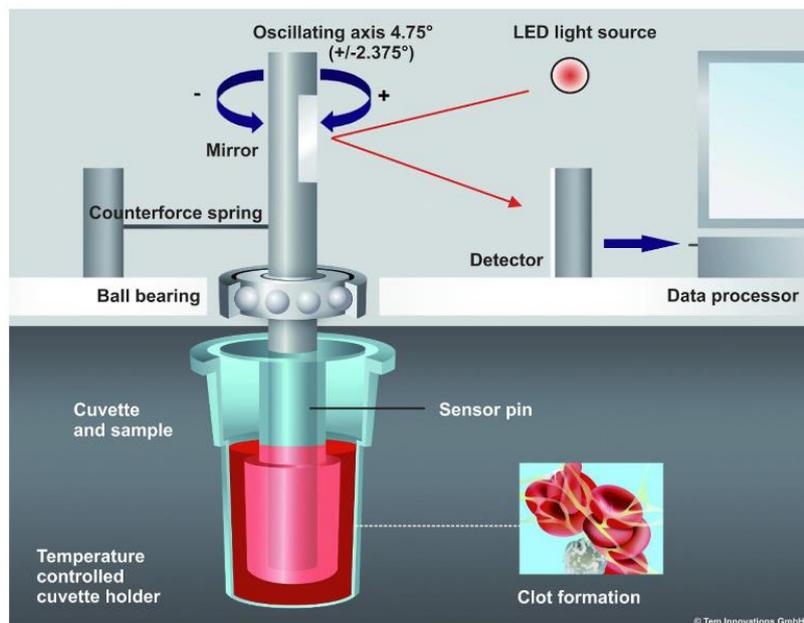


Figure 50 : Un thromboélastomètre est composé d'une cuve fixe à température contrôlée, dans laquelle est déposé le sang à analyser. 340 μ L de sang, provenant d'un tube citraté, sont déposés dans la cuve. Une tige métallique est immergée dans l'échantillon et effectue un mouvement d'oscillation

de 4°75' toutes les 6 secondes. La force viscoélastique du caillot interfère avec le mouvement circulaire de la tige. La rotation de la tige (qui diminue avec la coagulation) est détectée par un lecteur optique (LED) captant son mouvement. Le résultat est sous la forme d'un signal graphique (562).

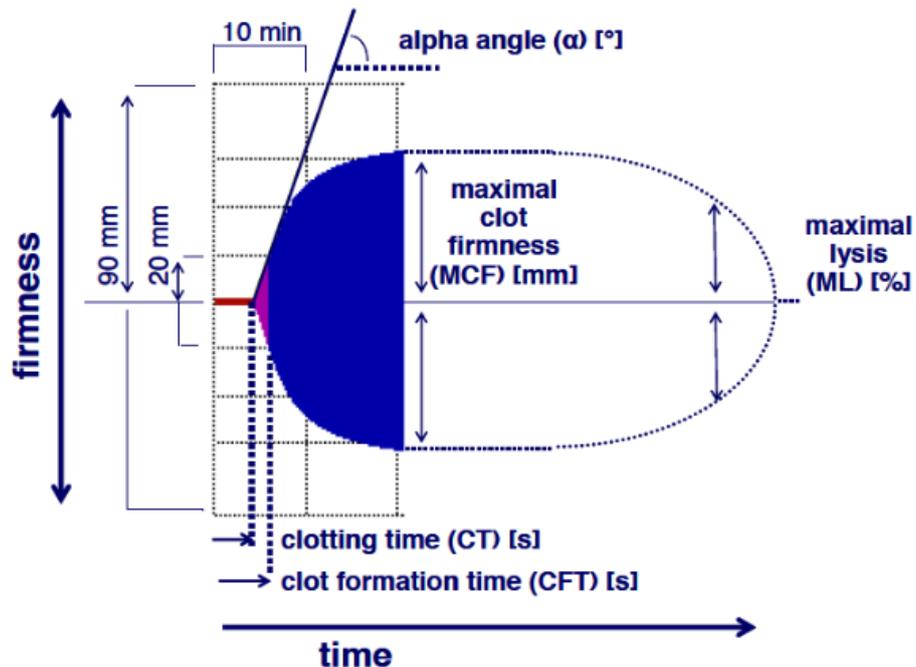


Figure 51 : Les différents paramètres analysés sont en ROTEM sont :

- CT (clotting time, en secondes) correspondant au temps jusqu'à la formation d'un caillot de 2 mm
- A5, correspondant à l'amplitude du caillot à 5 minutes
- A20, correspondant à l'amplitude du caillot 20 minutes
- Angle α , correspondant à l'angle en degrés à 2 mm de caillot
- MCF (maximal clot firmness, en mm) correspond à la résistance finale du caillot
- LT (lysis time, en secondes) et le LOT (lysis onset time, en secondes), le temps pour atteindre $\geq 15\%$ de lyse du caillot.

Ils existent différentes approches pour analyser la coagulation, en fonction de l'utilisation (EXTEM[®]) ou non (NATEM[®]) d'un activateur de la coagulation, de l'inhibition de l'effet des plaquettes (FIBTEM[®]) ou si l'objectif est d'analyser plus précisément la fibrinolyse (TEMACT[®]).

Le NATEM[®] est un test sans activateur de la coagulation. La coagulation est initiée par le contact du sang avec la surface de la cuvette. L'activation de la coagulation est longue mais permet la détection des troubles légers de la coagulation.

L'EXTEM[®] analyse la coagulation après l'activation par le facteur tissulaire.

Le FIBTEM® est un EXTEM® avec l'ajout d'inhibiteur plaquettaire (la cytochalasine) pour analyser la coagulation sans l'effet des plaquettes.

Le TEMA CT correspond à un EXTEM® en présence de 0.625 µg/mL de tPA (Actilyse, Boehringer-Ingelheim, Paris, France) pour analyser la fibrinolyse.

Les paramètres analysés pour les NATEM®, EXTEM®, et FIBTEM sont le CT, A5, A20, angle α , MCF. En TEMA CT, on mesure le LT et le LOT.

Le sang total est analysé en NATEM®, EXTEM®, et FIBTEM®.

2. Autres prélèvements biologiques

Un tube hépariné avec gel a été prélevé afin de réaliser des dosages de marqueurs de l'hémolyse tels que LDH, bilirubine totale, ASAT et haptoglobine, évaluer la fonction rénale (créatinine) et rechercher un syndrome inflammatoire (CRP), un trouble du métabolisme du fer avec la ferritinémie (carence ou surcharge). Un dosage de beta HCG a été réalisé afin de rechercher une grossesse non connue qui interdirait l'inclusion. Un tube sec a permis de dépister une dénutrition pouvant ralentir la cicatrisation de l'ulcère. Il s'agit de prélèvements réalisés en routine chez le patient atteint de pathologie drépanocytaire. Les analyses ont été réalisées en biochimie aux HCL.

3. Marqueurs de l'inflammation :

Les protéines de l'inflammation (TNF-alpha, Interleukin-1 alpha (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-15) ont été dosés après un prélèvement sanguin veineux. Le sang a été centrifugé et stocké à -80°C puis les protéines ont été quantifiées à l'aide de la technologie Luminex® xMAP® (Figure 52) avec le Human ProcartaPlex Mix and Match Panel (ThermoFischer Scientific) selon les recommandations du fabricant.

La technologie Luminex® xMAP® est un immunodosage basé sur microbilles permettant jusqu'à 100 analyses en simultanée. Les microbilles, codées par couleur, sont teintées en interne avec une proportion variable de fluorophores rouges et infrarouges, correspondant à une signature spectrale distincte. Des anticorps spécifiques aux analyses prévues sont couplés à une région de bille.

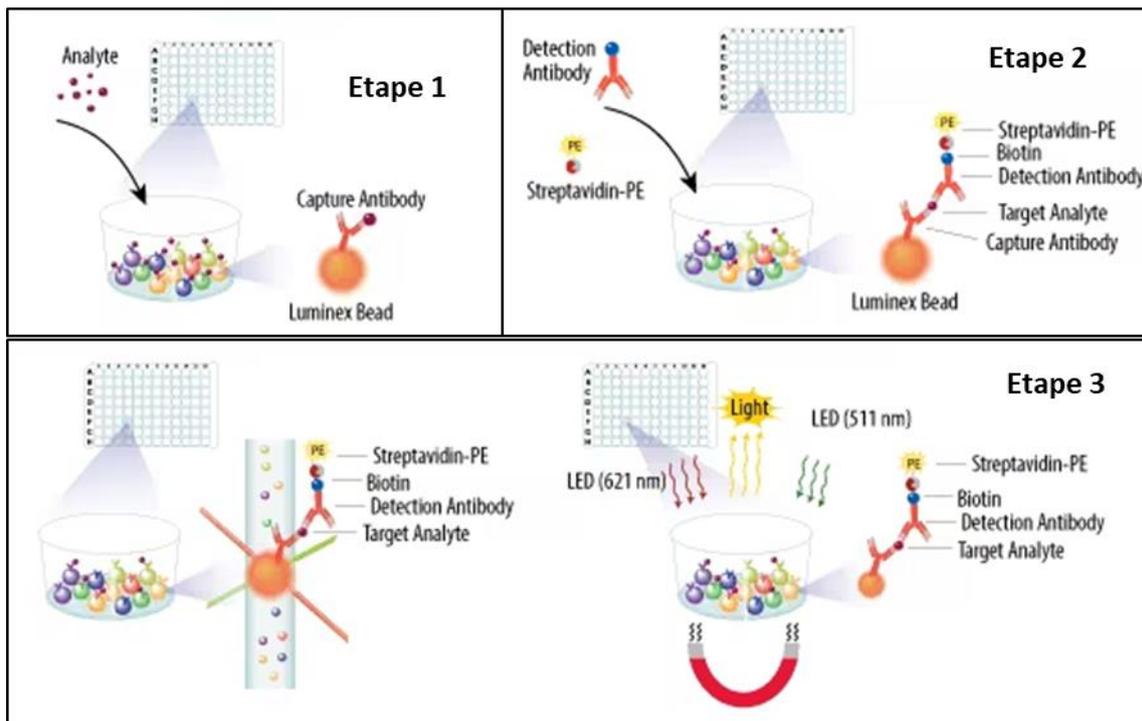


Figure 52 : Principe du dosage Luminex. (1) L'échantillon est ajouté à un mélange de micro billes pré colorées et pré recouvertes avec les anticorps des molécules analysées. Ces anticorps se fixent aux molécules d'intérêt. (2) Les anticorps de détection biotinylés, spécifiques des molécules analysées, sont ajoutés et forment un sandwich anticorps-antigène. La phycoérythrine (PE) conjuguée la streptavidine est ajoutée. Elle se fixe aux anticorps de détection biotinylés. (3) A l'aide d'un lecteur de plaque Bioplex 200 (AniRA, Lyon, France), les billes ont été excitées par un laser pour déterminer l'analyse assignée à chaque région. Un autre laser a déterminé l'ampleur du signal dérivé de la PE, qui est proportionnel à la quantité analysée. Plusieurs lectures ont été effectuées pour chaque région de bille.

Ont également été analysés de la même manière : VEGF-A, MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-9, et le TIMP-1.

Il s'agissait d'examen réalisés spécifiquement dans le cadre du protocole. Ces mesures ont été réalisées sur la plateforme AniRA, Lyon, France.

4. Viscosité sanguine et ses déterminants rhéologiques

Ces mesures ont été réalisées sur la plateforme de rhéologie du sang du laboratoire LIBM EA7424 (Equipe Biologie Vasculaire et du Globule Rouge) située au laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire, Centre de Biologie et de Pathologie Est des Hospices Civils de Lyon.

4.1 Viscosité sanguine

La viscosité sanguine a été mesurée à l'aide d'un viscosimètre cône/plan (Brookfield LVDVII+ PRO, with CPE40 spindle, Brookfield Engineering Labs, Natick, MA) (3).

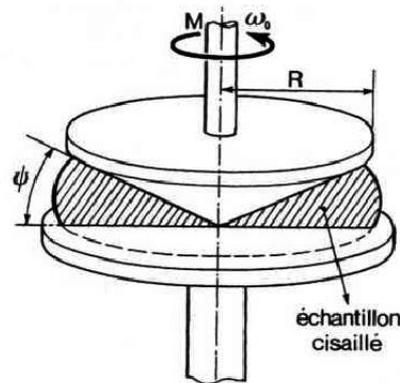


Figure 53 : Schéma du système cône plan

Le cône/plan est constitué d'un plan horizontal surmonté d'un cône. (Figure 53) Les 2 éléments ont des diamètres identiques et le sommet du cône est situé sur la surface du plan. Le cône est animé d'un mouvement de rotation et le plan est immobile.

Le viscosimètre cône/plan est utilisé pour les fluides non newtoniens. L'échantillon est placé au centre du plan. La contrainte de cisaillement s'exprime en fonction de la vitesse de rotation du cône et de l'angle d'ouverture Ψ . Le cône tourne à des vitesses variables, ce qui permet de déterminer la viscosité pour chaque niveau de vitesse cisaillement.

Dans notre étude, la viscosité sanguine a été mesurée après oxygénation complète du sang, à hématocrite natif, à 25°C et pour 3 fréquences de cisaillement : 45, 90, et 225 s⁻¹ Il s'agissait d'un cône CPA-40Z avec un angle d'ouverture de 0.8°.

Le ratio hématocrite/viscosité sanguine a été calculé en utilisant l'hématocrite déterminé par la technique de micro centrifugation (563).

4.2 Déformabilité érythrocytaire

La déformabilité des GRs a été mesurée par ektacytométrie (LORRCA, *Laser-assisted Optical Rotational Red Cell Analyzer*, Mechatronics, The Netherland) (Figure 54).

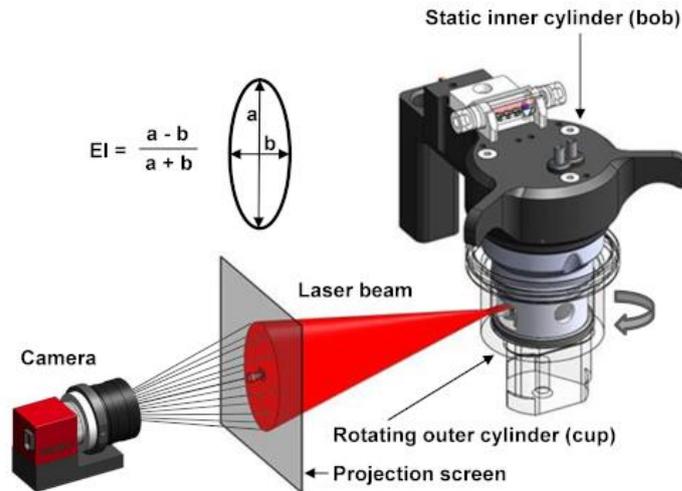


Figure 54 : Configuration schématique de l'ektacytomètre (564). L'ektacytomètre utilise un système couette pour appliquer la contrainte de cisaillement sur les cellules. Un cylindre extérieur de rotation (cup) et un cylindre intérieur statique (bob) sont employés pour induire la contrainte de cisaillement sur le flux laminaire. Entre le bob et la cup, il y a un petit écart (entrefer) dans lequel la suspension de sang est injectée. Un faisceau laser est généré à l'intérieur du bob, traverse la suspension du sang, et est dispersée par la présence de GRs. Le modèle de diffraction est projeté. Une ellipse théorique est superposée sur la forme elliptique du pattern de diffraction laser afin de déterminer un indice d'élongation (IE) qui dépend de la hauteur (a) et de la largeur (b) de l'ellipse. Plus EI est grand, plus les GRs sont déformables.

Les mesures ont été réalisées à 37°C et à l'hématocrite du patient, selon les recommandations (3).

En mode déformabilité, l'échantillon sanguin oxygéné est mélangé à une solution hypervisqueuse iso-osmolaire : le polyvinylpyrrolidone (viscosité 30 cp) à hématocrite 1%. Le PVP a une viscosité supérieure à celle du sang ce qui va entraîner une rotation de la membrane autour du cytoplasme du GR en réponse au flux engendré par la rotation, pour se conformer en ellipse (18). L'élongation des GRs est mesurée en fonction d'une contrainte de cisaillement croissante (0.3 Pa à 30 Pa), en normoxie.

En mode oxygenscan, la contrainte de cisaillement appliquée est fixe, c'est le gradient d'oxygène qui varie. L'échantillon sanguin (20 µL) est mélangé avec 2 mL d'Oxy ISO (viscosité 28,34 cp). Les paramètres déterminés sont : la déformabilité maximale du GR en normoxie (EI_{max}), la déformabilité minimale du GR en hypoxie (EI_{min}) et la pression en oxygène pour laquelle le GR commence à falciformer (PoS pour point of sickling) (Figure 55).

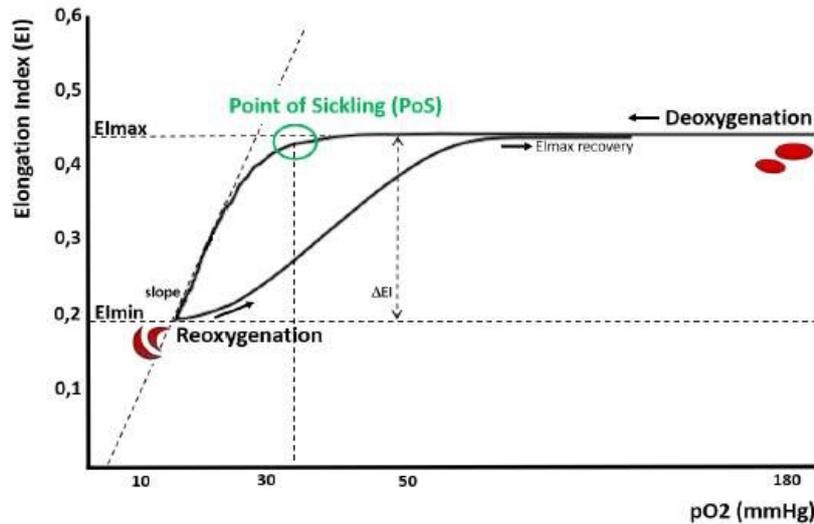


Figure 55 : Courbe de falciformation des GRs en Oxygenscan. Les GRs en suspension soumis à la contrainte de cisaillement sont désoxygénés jusqu'à atteindre le PoS. Elmax et Elmin indiquent la déformabilité maximale en normoxie et en hypoxie.

4.3 Agrégation érythrocytaire

L'agrégation des GRs a été déterminée à 37°C par syllectométrie (rétrodiffusion laser en fonction du temps, par le LORRCA) après ajustement de l'hématocrite à 40 %.

Cette technique mesure les variations d'intensité de la lumière réfléchie par les GRs en suspension ; lorsque les GRs s'agrègent, le nombre de particule diminue et leur taille augmente. La lumière rétrodiffusée diminue en conséquence. Le sang est placé entre un cylindre fixe et un cylindre en rotation pour rompre les agrégats préexistants par un cisaillement de 800 s^{-1} (Figure 56).

Le LORRCA mesure également la force des agrégats érythrocytaires. Il impose des vitesses de cisaillement successives pour déterminer la contrainte de cisaillement minimale requise pour rompre les agrégats érythrocytaires (127).

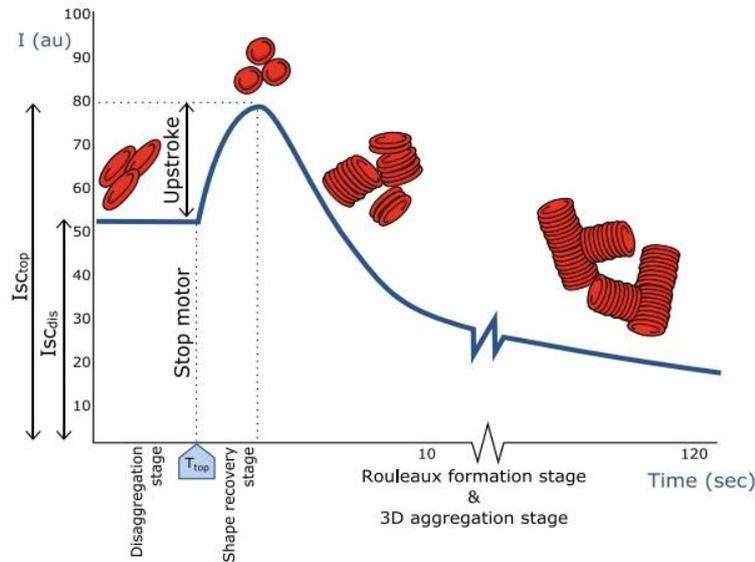


Figure 56 : Syllactogramme. Une haute contrainte de cisaillement entraîne la désagrégation des GRs ainsi que leur allongement, orienté selon le sens du flux. Cette étape est suivie d'un arrêt brutal entraînant la reprise d'une conformation normale, biconcave, orientée de manière aléatoire. L'agrégation débute et forme des rouleaux. Le syllactogramme représente l'intensité rétrodiffusée du laser (Isc) en fonction du temps. A partir de cette courbe, le logiciel calcule l'index d'agrégation (AI). Plus il est élevé, plus les GRs ont tendance à s'agréger entre eux.

Etude de la fonction vasculaire

1. Mesure des pressions artérielles

Les pressions artérielle (PA) brachiales systolique et diastolique ont été mesurées selon les recommandations (565) avant et après les mesures de flux sanguins. Une pression artérielle $\leq 120/70$ mmHg était considérée comme normale. Les patients avec une PA $>120/70$ mmHg à 2 mesures étaient considérés comme ayant une hypertension artérielle (566,567).

Les pressions artérielles à la cheville et/ou à l'orteil ont été mesurées selon le protocole standardisé. Les patients avec un index de pression systolique en cheville $< 0,90$ ou un index de pression systolique à l'orteil $< 0,70$ étaient considérés comme ayant une artériopathie des membres inférieurs (568).

2. Mesure de la TcPO2

La mesure de la pression transcutanée en Oxygène (TcPO2) permet de mesurer la quantité d'oxygène ayant diffusé depuis les capillaires à travers la peau dans un milieu liquide en fonction du gradient de

pression en oxygène. Cette valeur reflète l'oxygénation de la peau. Il a été démontré que la mesure de la TcPO₂ permet de prédire la cicatrisation en cas de plaie aux membres inférieurs chez les patients avec artériopathie des membres inférieurs, non drépanocytaires (569–571).

La mesure de la TcPO₂ a été réalisée avec un moniteur TCM 400 (Radiometer, Neuilly-Plaisance, France) réglé par défaut à 43°C (572). Les électrodes ne sont pas en contact direct avec la peau mais avec un liquide dans lequel la quantité d'oxygène ayant diffusé à travers la peau, grâce au chauffage, va être mesurée (Figure 57).

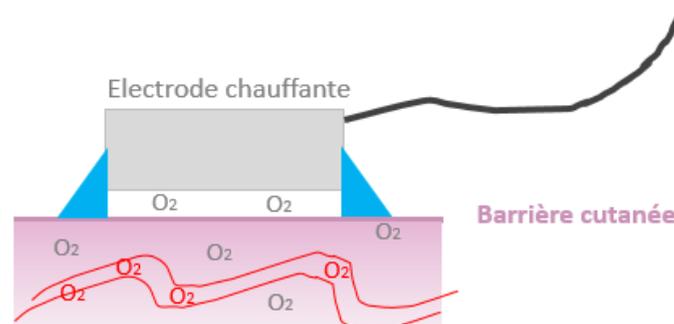


Figure 57 : Méthode de mesure de la TcPO₂ (générée sur powerpoint)

Les électrodes étaient placées au 1^{er} espace inter métatarsien. La valeur de TcPO₂ était recueillie après 20 minutes de mesure et stabilisation. Une valeur était considérée de bonne qualité s'il y avait bien une chute initiale de la valeur.

Etude de la dysfonction endothéliale

1. Etude de la vasodilatation

La fluxmétrie laser Doppler permet l'évaluation de la perfusion micro vasculaire (573). Le principe repose sur l'interaction lumière laser-tissus et s'appuie sur l'effet Doppler. Lorsque la peau est illuminée par une lumière laser, une partie de l'énergie incidente est rétrodiffusée par des GRs en mouvement, créant un motif d'interférence et modifiant la fréquence. La variation de fréquence permet de calculer la vitesse relative des particules en suspension par rapport à la détection et d'en déduire la vitesse d'écoulement sanguin dans les vaisseaux.

La dysfonction endothéliale est détectable par des techniques d'étude intégrée des interactions neurovasculaires cutanées et iontophorèse (574). L'iontophorèse est une technique utilisant des

courants de faible intensité (inférieure au mA) pour faire diffuser de manière strictement non-invasive des molécules pharmacologiques à un niveau local en évitant toute action systémique (Figure 58). Des iontophorèses d'acétylcholine (agent vasodilatateur endothélium-dépendant) ou physiques (courant iontophorétique, chaleur) sont réalisées pour étudier la vasodilatation.

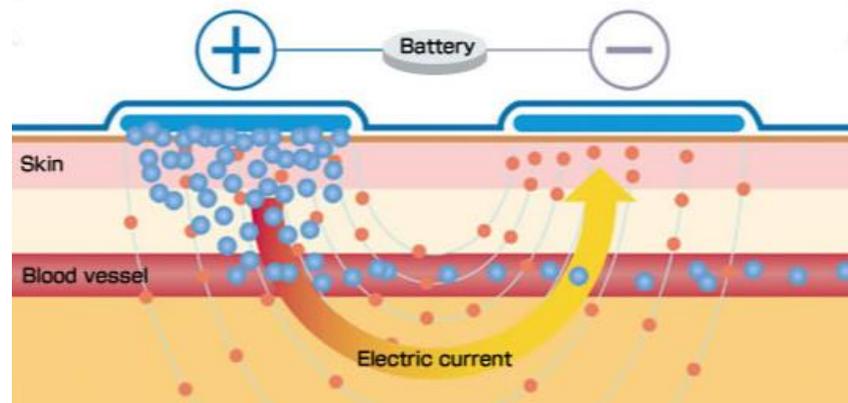


Figure 58 : Principe de la iontophorèse. L'iontophorèse utilise un faible courant électrique pour faire passer des molécules à travers la peau. Le courant est anodal pour la diffusion de l'acétylcholine (chargé positivement).

Tous les patients ont bénéficié de cette évaluation en position semi assise. Le flux sanguin était mesuré par Laser Doppler fluxmétrie (Laser Doppler PF5010, Perimed) en réponse à différents stimuli présentés ci-dessous :

1) l'administration iontophorétique (courant anodal 100 μ A ; 20 secondes) d'Acétylcholine (Ach, 2%). La stimulation par l'acétylcholine entraîne un pic initial médié par l'activation de la COX puis une phase plateau médiée par le NO, permettant d'étudier ces 2 voies de la vasodilatation (Figure 59).

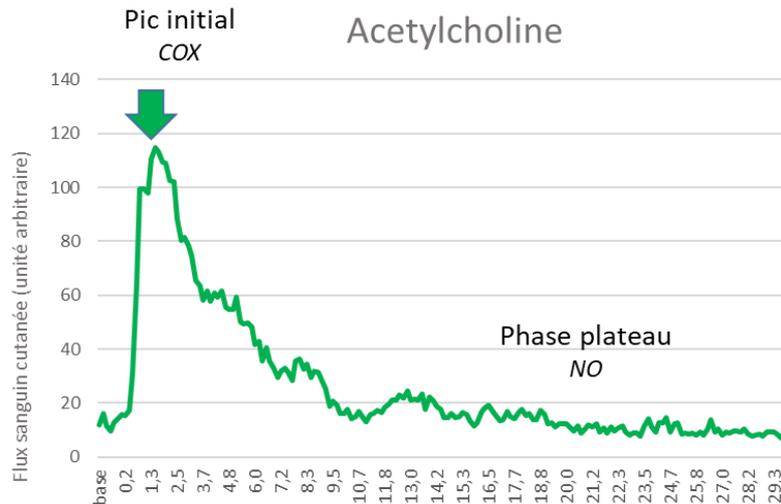


Figure 59 : Exemple de courbe de laser Doppler en réponse à l'Acétylcholine (générée par excel). La iontophorèse à l'Acétylcholine entraîne une vasodilatation via les COX au niveau du pic puis via le NO au niveau du plateau (575).

2) courant cathodal (100 μ A ; 60 secondes) d'eau désionisée. La iontophorèse entraîne une vasodilatation induite par le courant non spécifique (Figure 60). L'utilisation d'eau désionisée permet d'obtenir des données sur un site contrôle (576).

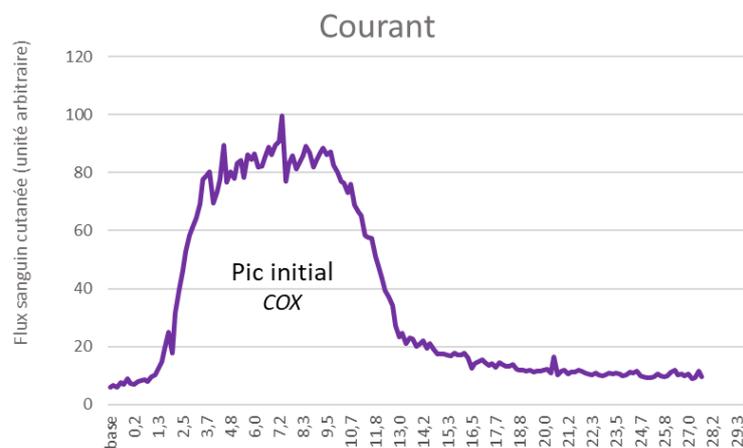


Figure 60 : Exemple de courbe de laser Doppler en réponse au courant (générée par excel).

3) chauffage local. Le chauffage local de la peau entre 39 et 44 °C entraîne une réponse biphasique. Un pic initial est observé 2 à 3 minutes après le début du chauffage, dépendant principalement du réflexe axonal local (577). La phase plateau tardive dépend majoritairement de facteurs endothéliaux, parmi lesquels le NO serait responsable des 2/3 de la réponse, le reste serait EDHF-dépendant (Figure 61).

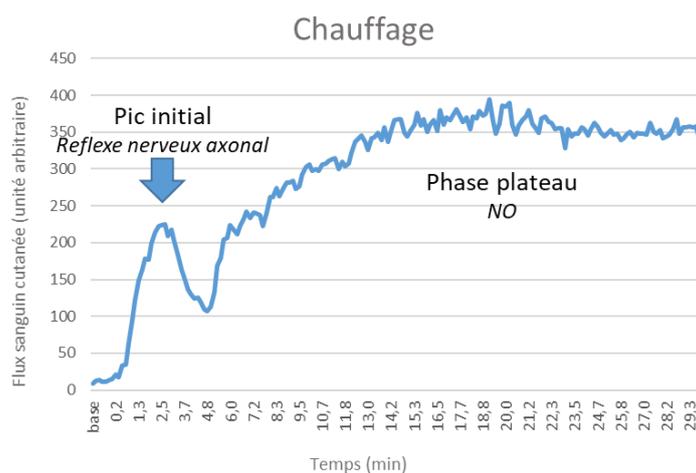


Figure 61 : Exemple de courbe de laser Doppler en réponse au chauffage (générée par excel). Il entraîne un pic initial principalement dépendant du reflexe nerveux axonal puis une phase plateau dépendant principalement du NO (578–580).

Avant d'appliquer le chauffage ou les courants iontophorétiques, le flux sanguin basal a été mesuré pendant 2 minutes. Les modifications du flux sanguin ont été mesurées de manière continue pendant 30 minutes par le laser Doppler sur chacun des 3 sites (ach, courant, chauffage) pour évaluer en temps réel l'effet de la stimulation sur la peau.

Le chauffage à 42°C a été réalisé avec une sonde laser Doppler à un 3e site, juste en dessous du pli du coude. Nous avons choisi de ne pas positionner les électrodes près des ulcères de crainte d'une fragilité de la peau avec risque d'une nouvelle plaie et pour évaluer une atteinte micro vasculaire systémique. C'est ce qui a été fait pour l'étude de la fonction micro vasculaire pour les plaies diabétiques (550).

2. Evaluation de la fonction sensorielle cutanée

Les réponses vasculaires au courant et à la chaleur reposent sur des fibres nerveuses sensorielles. La sensibilité nerveuse (mécanique et thermique) a été évaluée par 4 tests simples utilisés en pratique clinique quotidienne : le test au mono filament (utilisé surtout par les diabétologues à la recherche d'une neuropathie diabétique), le test chaud/froid, le test pique/touche et la pallesthésie (sensibilité vibratoire). Pour le test au mono filament, un set de 20 mono filaments de force décroissante entre 300 g et 0,008 g a été utilisé. Pour le test chaud/froid, j'ai utilisé des tubes de prélèvement sanguin remplis avec de l'eau chaude autour de 45 °C et de l'eau froide autour de 4°C. La sensibilité vibratoire a été évaluée sur le trapèze et l'extrémité distale du radius pour les membres supérieurs et sur

l'extrémité distale du tibia et la base du 1^{er} métatarsien pour les membres inférieurs. Les autres tests ont été réalisés sur les 2 faces internes des avant-bras et autour des chevilles et sur les pieds.

Plus rarement atteint, le membre supérieur est utilisé comme référentiel par rapport aux membres inférieurs. Tous les tests ont été répétés au moins 3 fois.

3. Prélèvement de l'exsudat (chez les patients LU+ uniquement)

L'exsudat a été collecté par application d'une bande stérile de papier absorbant (Schirmer strips, Alcon, Canada) pendant 5 minutes. Les protéines ont été éluées de la bande de papier par une centrifugation réfrigérée dans 1 ml de tampon (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 0.05% Brij-35, pH 7.6) pendant au moins 2 heures. Après retrait de la bande, la solution de protéines était stockée à -20°C jusqu'à l'analyse des protéines (530).

Culture cellulaire

Des cellules endothéliales HDMEC (Human Dermal Microvascular Endothelial Cell) (HDMEC) ont été achetées chez PromoCell (#C-12262). Les HDMEC ont été cultivées sur *Endothelial Cell Growth Medium MV2* (PromoCell, #C-39221) à 37°C et 5% CO₂. La culture a été passée au maximum 5 fois selon les recommandations du fabricant. Pour les expérimentations, les HDMEC ont été traitées avec du milieu de culture supplémenté par 5% de plasma des patients drépanocytaires avec (LU+) et sans (LU-) ulcère de jambe.

1. Isolation de l'ARN total et qPCR

L'expression de l'ARNm des HDMEC traitées par le plasma de patients avec ulcère (LU+) et sans ulcère (LU-) a été analysé. L'ARN total a été isolé par la procédure chloroforme/phénol (Trizol Reagent, Thermo Fisher Scientific, #15596018). Les ARNs ont été reverse-transcrits en ADNc avec le kit *PrimeScript RT Reagent* (Takara Bio Europe, #RR037A) et des *primers* spécifiques des gènes d'intérêt.

Tableau 1 : Séquences des amorces pour la qPCR

Gène	Forward	Reverse
TBP	5' AGACCATTGCACTTCGTGCC 3'	5' CCTGTGCACACCATTTTCCC 3'
NOS3 (eNOS)	5' TGAGACCTTCTGTGTGGG 3'	5' CTGGAACATCTTCCGCCTGTGC 3'
PTGS1 (COX1)	5' GTGTGTGTGACCTGCTGAAG 3'	5' GCTGCAGGAAATAGCCACTC 3'
PTGS2 (COX2)	5' CTGCGCCTTTTCAAGGATGG 3'	5' TCCTGCCCCACAGCAAAC 3'
VCAM1	5' ATTAACCAGGCTGGAAGAAG 3'	5' TGACAGTGTCTCCTTCTTTG 3'

SELE	5' CCTGCTACCTACCTGTGAAG 3'	5' AGCTTCCATCTGATTCAAGG 3'
------	----------------------------	----------------------------

L'analyse a été faite en temps réel par qPCR avec la *TB Green Premix ExTaq* (Takara Bio Europe, #RR42WR). Les résultats ont ensuite été normalisés à l'expression de la *TATA-box binding protein* (TBP), comme gène de ménage (22).

2. Western Blot

Le Western Blot a été réalisé sur les HDMEC incubées avec du plasma de patients LU+ et LU-. Les protéines ont été extraites des HDMEC avec un tampon RIPA (Cell Signaling #9806S) contenant un cocktail de protéases et d'inhibiteurs de phosphatases (Thermo Fisher Scientific, #A32955). Après quantification avec le kit *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific, #23227), 20 µg de protéines étaient chargés sur un gel de protéine manufacturé 4–20% (BioRad, #4561095) puis transféré sur une membrane de nitrocellulose (Biorad, #1704272) par transfert semi-sec. La membrane était incubée 1 heure à température ambiante dans un tampon bloquant (TBS-Tween-20 0.1%, 5% BSA) puis marquée pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires ciblant eNOS, phospho-eNOS (Ser1177), ERK and phospho-ERK1/2(Thr202/Tyr204)

Tableau 2 : Référence des anticorps utilisés pour le Western Blot

	Anticorps	Reference Cellsignaling	Dilution	Espèce
Anticorps primaire	eNOS	#32027	1/1000	Lapin
	Phospho-eNOS	#9571		
	ERK	#4695		
	Phospho-ERK	#4370	1/2000	
Anticorps secondaire	Anti-Rabbit HRP	#7074	1/1000	

Après rinçage, l'anticorps secondaire anti-HRP était appliqué sur la membrane pendant 1 heure à température ambiante. La membrane a été révélée avec un substrat luminescent (Biorad, #1705060). Le signal a été détecté par ChemiDoc (LYOS, Lyon, France).

II. Résultats

Cette thèse rapporte l'analyse des 65 patients inclus dans l'étude DrepanO2. Le recrutement des patients s'est fait avec l'aide des médecins suivant les patients drépanocytaires et par contact téléphonique. Le contexte de l'étude ainsi que les examens prévus ont été expliqués. Plusieurs patients ont refusé quand ils ont su que l'étude nécessitait une prise de sang. Les prises de sang sont souvent plus difficiles et douloureuses pour les patients drépanocytaires. Après accord oral, les patients sont venus dans l'unité de médecine vasculaire soit à l'occasion d'un examen ou hôpital de jour pour le suivi de leur drépanocytose, soit spécialement pour la participation à l'étude ou encore à l'occasion du suivi de leur plaie pour les patients avec ulcère (LU+). La prise de sang a été réalisée en même temps que celle de l'hôpital de jour quand cela était possible. Les patients sans ulcères (LU-) ont été dédommés de 30 euros pour leur participation.

A leur arrivée, les patients étaient accueillis et le consentement était recueilli par écrit après ré-explication du contexte de l'étude, des investigations prévues et du temps nécessaire (soit environ 2 heures). Après signature des consentements, les informations cliniques étaient relevées en présence du patient pour confirmation par celui-ci. Le patient a été installé dans une pièce thermo régulée, au calme, en position semi-allongée. La pression artérielle était mesurée après quelques minutes de repos puis mise en place des différents capteurs pour les mesures du flux sanguin cutané par laser doppler. La nature non douloureuse de l'examen était rappelée au patient ainsi que la nécessité de ne pas bouger pendant toute la durée de l'examen, soit 30 minutes environ. Les sondes laser doppler étaient placées sur la face interne de l'avant-bras. Après stimulation par le courant et l'acétylcholine, les électrodes de TcPO₂ étaient mises en place sur les pieds. A la fin des 30 minutes, l'ensemble des capteurs était retiré puis le patient participait à des tests sensitifs en fermant les yeux : d'abord chaud/froid, mono filament de Von Frey, pique/touche et vibration. Les patients étaient informés des résultats des tests sensitifs et de la mesure de la TcPO₂ en direct. Ils étaient également informés que les mesures en laser doppler n'avaient pas d'interprétation clinique directe et qu'il s'agissait de recherche.

Un(e) IDE de l'unité venait ensuite faire la prise de sang si celle-ci n'avait pas été réalisée pendant l'hôpital de jour. Les tubes de biologie standard étaient envoyés au centre de biologie est via le pneumatique. J'ai amené moi-même les tubes pour la rhéologie du sang et la collecte du plasma. J'ai effectué le traitement des tubes pour environ 1/3 des patients inclus.

Par la suite, Etienne Turpin, étudiant en master M2, a mis en place la culture cellulaire, la culture avec le plasma des patients ainsi que toutes les mesures sur matériel cellulaire : western blot, qPCR et multiplex.

Il n'est pas possible d'interpréter les données démographiques comme il s'agissait d'inclusions non consécutives limitées aux patients volontaires. Toutefois, les plaies des patients drépanocytaires suivies de notre centre avaient des critères moyens de taille et de durée d'évolution correspondant à ceux rapportés comme de mauvais pronostic de cicatrisation par une précédente cohorte française.

Sur le plan clinique, les ulcères étaient associés à une plus faible fréquence de CVOs, comme décrit dans le phénotype hémolytique.

Au niveau biologique, nous n'avons pas retrouvé un degré plus important d'hémolyse ou d'inflammation par rapport aux patients n'ayant jamais eu d'ulcères, comme dans les études plus anciennes. Comme nous l'avons mentionné dans notre revue (581), l'explication peut provenir de l'effet du traitement médical spécifique de la drépanocytose (Hydroxyurée et Voxelotor) qui agissent sur l'hémolyse et de la compression veineuse pour les ulcères qui a été rapportée comme capable de diminuer l'inflammation. De même, nous n'avons pas trouvé de différence pour le VEGF et les MMPs/TIMP en fonction de la présence ou non d'ulcère. Cela explique probablement pourquoi nous n'avons pas vu de différence en termes d'activation cellulaire et des voies de signalisation de la vasodilatation, lorsque nous avons appliqué le plasma de patients avec et sans ulcère sur des cultures de cellules endothéliales.

Au niveau fonctionnel, nous avons montré que les patients drépanocytaires avec ulcère ont une altération de la vasodilatation cutanée (Acétylcholine, courant et chauffage) mais nous ne savons pas si ce défaut est présent avant l'apparition de la 1^{ère} plaie et s'il pourrait prédire l'apparition des ulcères. La pression transcutanée en oxygène était significativement abaissée chez les patients avec ulcère. Il s'agissait de la première étude comparant la fonction micro vasculaire cutanée des patients drépanocytaires en fonction du statut « ulcère de jambe ».

Il n'a pas été possible d'analyser les facteurs explicatifs du retard de cicatrisation car seuls 2 patients sur 8 suivis n'ont pas cicatrisé. Toutefois, nous avons mis en évidence une amélioration de la fonction de la microcirculation cutanée après cicatrisation.

En conclusion, le résultat principal de notre étude est la mise en évidence, par plusieurs techniques différentes, d'une altération fonctionnelle de la microcirculation cutanée chez les patients drépanocytaires, qui s'améliore avec la cicatrisation. Un nouveau contrôle plus à distance permettrait

de savoir s'il s'agit d'une amélioration permanente (jusqu'à la prochaine plaie) ou temporaire en lien avec la phase de résolution de l'inflammation.

Caractéristiques cliniques des patients inclus selon la présence d'un ulcère

65 patients drépanocytaires ont été inclus tous génotypes SS à l'exception de 5 patients S β^0 dans le groupe sans ulcère. Neufs patients ont été inclus dans le groupe ulcère dont 7 patients avec un ulcère actif, un patient avec 2 ulcères actifs et un patient avec 3 ulcères actifs (Figure 62). L'âge moyen au premier ulcère était de 35.5 ± 18.8 ans.



Figure 62 : Photo d'un ulcère actif d'un patient inclus

La surface moyenne des ulcères était de 10.3 ± 10.1 cm². Il n'y avait pas de côté prédominant (4 à la jambe droite et 8 à la jambe gauche) ni de malléole prédominante (8 à la malléole externe et 4 à la malléole interne). Les ulcères évoluaient moyenne depuis 8.3 ± 7.5 mois, au moment de l'inclusion.

Les patients avec ulcères (LU+) étaient plus âgés que ceux sans ulcères (LU-) ($p < 0,0001$, Tableau 3), mais il s'agit probablement d'un biais de sélection. Il n'y avait pas de différence de répartition de sexe entre les 2 groupes. Les patients avec ulcère avaient fait plus de CVOs dans les 2 années précédant l'inclusion ($p < 0,002$, Tableau 3). Il n'y avait pas d'association entre les ulcères de jambe et une autre complication clinique de la drépanocytose (syndrome thoracique aigue, hypertension pulmonaire, AVC ischémique, priapisme, ostéonécrose et rétinopathie). Les patients du groupe ulcère avaient plus fréquemment un antécédent de maladie veineuse thromboembolique ($p < 0,001$, Tableau 3).

Les évènements thromboemboliques veineux étaient répartis comme suit :

- Dans le groupe sans ulcère : 8 patients concernés par 13 épisodes au total dont 9 embolies pulmonaires (4 patients ont fait plus d'un événement profond) ; seuls 2 épisodes (2 patients différents) étaient non provoqués par une CVO, une chirurgie ou une infection.
- Dans le groupe ulcère : 6 patients concernés par 8 épisodes au total dont 6 embolies pulmonaires et 1 thrombose veineuse cérébrale ; un seul patient a fait 2 embolies pulmonaires sans facteur déclenchant majeur.

Les œdèmes des membres inférieurs et la nécessité d'une assistance technique pour la mobilisation étaient plus fréquents chez les patients avec ulcères ($p < 0,001$ et $p 0,048$, respectivement) (Tableau 3).

Tableau 3. Comparaison du phénotype clinique des patients drépanocytaires avec (LU+) et sans ulcère (LU-)

	LU+ n=9	LU- n=56
Génotype HbSS	9 (100)	51 (91.1)
Age (années)	48.5 ± 9.2	31.8 ± 10.7***
α-thalassémie	4 (50.0) /8	23 (41.1) /50
Sexe masculin	4 (44.0)	22 (39.3)
Indice de masse corporelle (kg/m ²)	23.6 ± 3.4	21.8 ± 3.6
CVOs (2 années précédentes)	0.6 ± 0.7	1.9 ± 2.3**
STAs (2 années précédentes)	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.7
Antécédent de STA	6 (66.7)	33 (58.9)
Hypertension pulmonaire	0	0
AVC ischémique	1 (11.1)	1 (1.8)
Priapisme	1 (25.0)	4 (18.2)
Ostéonécrose	4 (44.0)	15 (26.8)
Rétinopathie	0	5 (8.9)
Insuffisance respiratoire	0	2 (3.6)
Tabac actif	1 (11.1)	10 (17.9)
Dyslipidémie	1 (11.1)	1 (1.8)
Hypertension Artérielle traitée	0	4 (7.1)
Diabète	0	0
Maladie Veineuse Thromboembolique	6 (66.7)	7 (12.5)**
Hypertension Artérielle mesurée	3 (33.3)	7 (12.7)
Artériopathie des membres inférieurs	1 (11.1)	0
Assistance technique pour la mobilisation	2 (22.2)	1 (1.8)*
Œdèmes des membres inférieurs	8 (88.9)	4 (7.3)***

Valeurs présentées en n (%) ou moyenne ± écart type. Abréviations: LU, ulcère de jambe; CVO, crise vaso occlusive; STA, syndrome thoracique aiguë; AVC, accident vasculaire cérébral. Différence significative : * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.001$.

Il y avait plus de patients avec transfusion récente dans le groupe ulcère que dans le groupe sans ulcère ($p 0.005$, tableau 4), du fait d'un biais de recrutement ; lors du screening, les patients transfusés

n'étaient pas contactés alors que l'étude était proposée aux patients transfusés récemment avec une plaie en raison du faible nombre d'ulcère. Toutefois les mesures ont été réalisées le plus à distance possible de la précédente transfusion. Le temps moyen entre la participation à l'étude et la dernière transfusion était de 82±25 jours pour les 3 patients sans ulcères transfusés dans les 4 derniers mois et 48±22 jours pour les 4 patients avec ulcère transfusés dans les 4 derniers mois. Tous les patients étaient traités par Hydroxyurée, à l'exception de 3 patients sans ulcère (2 sous Voxelotor seul et 1 sans traitement modificateur de la maladie). Il n'y avait pas de différence parmi les traitements non spécifiques à l'exception des antalgiques de niveau 3 et de la compression veineuse qui étaient plus fréquents chez les patients avec ulcère (p 0.017 et p<0.0001, respectivement). Les antalgiques de niveau 3 correspondent aux opioïdes et sont prescrits pour les douleurs fortes en lien avec les ulcères de jambe ; soulignant bien le caractère douloureux engendré par la présence d'ulcère de jambe. La compression veineuse est un élément essentiel du traitement des ulcères veineux. Elle réduit l'œdème qui est, comme nous l'avons montré, plus fréquent chez les patients avec ulcère de jambe. La réduction de l'œdème permet de diminuer le volume d'exsudat et la macération de la plaie qui retardent la cicatrisation. Il n'y avait pas de différence en termes de traitement anticoagulant entre les 2 groupes.

Tableau 4 Comparaison des traitements des patients drépanocytaires avec (LU+) et sans (LU-) ulcère de jambe.

	LU+ n=9	LU- n=56
Pas de transfusion depuis 4 mois	5 (55.6)	53 (94.6)**
Traitements spécifiques		
Hydroxurée	6 (66.7)	53 (94.6)*
Hydroxyurée + Activateur de pyruvate kinase	0	1 (1.8)
Hydroxyurée + Voxelotor	1 (11.1)	2 (3.6)
Voxelotor	2 (22.2)	0*
Aucun	0	1 (1.8)
Dose moyenne d'Hydroxurée par semaine (mg)	6028 ± 2917	8508 ± 2696*
Chélateur du fer	2 (22.2)	2 (3.6)
Antalgique		
Aucun	3 (33.3)	35 (63.6)
Niveau 1	2 (22.2)	12 (21.8)
Niveau 2	2 (22.2)	8 (14.5)
Niveau 3	2 (22.2)	0*
Anti agrégant plaquettaire	1 (11.1)	2 (3.6)
Anticoagulant	3 (33.3)	7 (12.5)
Statine	1 (11.1)	1 (1.8)
Bloqueur du SRAA	2 (22.2)	5 (8.9)
Oxygénothérapie	2 (22.2)	2 (3.6)
Compression veineuse des membres inférieurs	8 (88.9)	4 (7.3)***

Valeurs présentées en n (%) ou moyenne \pm écart type. Abréviations: LU, ulcère de jambe; SRAA, système rénine angiotensine aldostérone. Antalgiques niveau 1, paracétamol ; niveau 2, tramadol, codeïne, nefopam ; niveau 3, morphiniques. Différence significative: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Nous avons évalué la sensibilité selon différentes modalités des patients en fonction de la présence ou non d'un ulcère de jambe. Il n'y avait pas de différence entre les 2 groupes pour le pique-touche, la vibration, la pallesthésie et le test de Von Frey aux membres supérieurs et inférieurs. La réponse à la chaleur et au froid aux membres inférieurs était d'avantage altérée chez les patients avec ulcères ($p = 0,0048$ et $0,007$, respectivement, Tableau 5), mais il n'a pas été observé de différence aux membres supérieurs.

Tableau 5. Comparaison des paramètres sensitifs entre les patients drépanocytaires avec (LU+) et sans (LU-) ulcère.

	LU+ n=9	LU- n=55
Evaluation numérique de la douleur (sauf douleur)	5.1 \pm 4.1	1.3 \pm 2.3*
TcPO2 au 1er espace inter métatarsien (mmHg)	53.0 \pm 10.0	67.5 \pm 13.5***
Sensibilité anormale au chaud		
Membres supérieurs	0	0
Membres inférieurs	2 (22.2)	1 (1.8)*
Sensibilité anormale au froid		
Membres supérieurs	0	0
Membres inférieurs	3 (33.3)	1 (1.8)**
Sensibilité anormale au test pic-touche		
Membres supérieurs	0	1 (1.8)
Membres inférieurs	1 (11.1)	1 (1.8)
Sensibilité anormale au test de vibration		
Membres supérieurs	0	0
Membres inférieurs	1 (11.1)	2 (3.6)
Test de Von Frey		
Membres supérieurs	0.02 \pm 0.02	0.008 \pm 0.002
Membres inférieurs	1.0 \pm 2.8	0.11 \pm 0.54

Valeurs présentées en n (%) ou moyenne \pm écart type. Abréviations: LU, ulcère de jambe ; TcPO2, pression transcutanée en oxygène. Différence significative: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Un patient sans ulcère n'a pas fait l'examen clinique en raison d'un manque de temps.

Objectif 1 : Etude de la fonctionnalité micro vasculaire

Pour étudier la fonctionnalité du compartiment micro vasculaire cutané (objectif 1), nous avons mesuré la TcPO₂ au 1^{er} espace intermétatarsien. Nos résultats montrent qu'elle était inférieure chez les patients avec ulcères ($p < 0,001$, Tableau 5). Il n'y avait pas de différence significative de la valeur de la TcPO₂ chez les patients avec ulcères en comparant la valeur au 1^{er} espace intermétatarsien et celle au bord de la plaie (55 ± 9 mmHg et 42 ± 16 mmHg, respectivement, $p 0.39$).

En laser doppler fluxmétrie, il n'y avait pas de différence entre les valeurs basales avant stimulation pour les 2 groupes. La réponse cutanée à la vasodilatation était réduite en réponse à l'Acétylcholine, au courant et au chauffage local dans le groupe avec ulcère ($p < 0,001$ pour tous) (Figure 63).

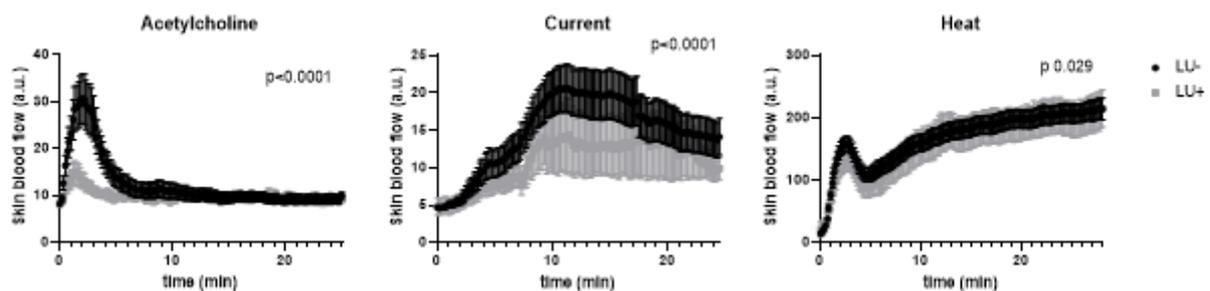


Figure 63 : Flux sanguin cutané de patients drépanocytaires avec (LU+) et sans ulcères (LU-) en réponse à l'Acétylcholine ($n=9$ LU+ et 56 LU-), au courant ($n=9$ LU+ et 56 LU-), et au chauffage local (42°C) ($n=9$ LU+ et 53 LU-). Les courbes représentent la moyenne \pm l'écart type à la moyenne. Toutes les réponses étaient significatives entre LU+ et LU- (test de Mann Whitney). Le flux sanguin est exprimé en unités arbitraires (a.u.) 3 patients ont été exclus du chauffage en raison d'incidents techniques.

Objectif 2: Caractéristiques biologiques

1. Biologie Standard

Les patients avec ulcère avaient un taux plus élevé d'hémoglobine, de neutrophiles et de fibrinogène ($p 0,035$, $0,041$ et $0,042$ respectivement, Tableau 6). L'albumine était plus basse chez les patients avec ulcère ($p < 0,001$, Tableau 6).

Tableau 6. Comparaison des paramètres biologiques des patients drépanocytaires avec (LU+) et sans (LU-) ulcère

	LU+ n=9	LU- n=56
Hémoglobine (g/dL)	10.4 ± 1.0	9.3 ± 1.5*
VGM (fl)	96.7 ± 17.7	91.4 ± 16.2
CCMH (g/100mL)	340 ± 3.5	347 ± 13
Globules Blancs (G/L)	9.0 ± 2.6	7.1 ± 2.8
Neutrophiles (G/L)	5.8 ± 2.4	4.1 ± 2.3*
Eosinophiles (G/L)	0.15 ± 0.12	0.16 ± 0.16
Basophiles (G/L)	0.04 ± 0.02	0.08 ± 0.12
Monocytes (G/L)	0.99 ± 0.39	0.70 ± 0.59
Lymphocytes (G/L)	2.0 ± 0.82	2.3 ± 0.86
Plaquettes (G/L)	388 ± 164	381 ± 245
Réticulocytes (G/L)	165 ± 39	163 ± 47
Réticulocytes (%)	7.6 ± 4.2	8.0 ± 4.9
D Dimères (ng/L)	1437 ± 740	2152 ± 1406
Temps de Prothrombine (sec)	14.4 ± 5.0	15.6 ± 15.0
Ratio TCA	1.06 ± 0.17	0.97 ± 0.13
Fibrinogène (g/L)	3.8 ± 1.2	3.1 ± 0.97*
Activité de la protéine C (%)	90.4 ± 13.9	84.5 ± 14.7
Antigène libre de la protéine S (%)	67.2 ± 29.5	71.6 ± 19.6
Créatinine (µmol/L)	54.8 ± 26.8	54.9 ± 12.2
Albumine (g/L)	38.7 ± 4.0	44.0 ± 4.0***
Préalbumine (g/L)	0.19 ± 0.04	0.22 ± 0.05
LDH (UI/L)	442 ± 94	451 ± 134
ASAT (UI/L)	68.3 ± 40.3	47.7 ± 21.9
Bilirubine totale (µmol/L)	47.9 ± 32.4	36.7 ± 18.8
Haptoglobine (g/L)	0.09 ± 0.14	0.08 ± 0.23
Ferritine (ng/mL)	354 ± 420	291 ± 300
CRP (mg/L)	12.1 ± 14.5	10.1 ± 26.2

Valeurs présentées en moyenne ± écart type. Abréviations: LU, ulcère de jambe; VGM, volume globulaire moyen ; CCMH, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ; TCA, temps de céphaline activée, LDH, lactate dehydrogenase; ASAT, aspartate amino transférase ; CRP, C réactive protéine. Différence significative: *p<0.05, ***p<0.001

Il est attendu que les transfusions récentes (<4 mois) diminuent l'hémolyse et donc les marqueurs d'hémolyse et améliore la rhéologie sanguine.

Les analyses ont donc été refaites en excluant les 7 patients ayant reçu une transfusion récente (<3mois) : 4 dans le groupe ulcère et 3 dans le groupe sans ulcère. Les résultats n'étaient pas modifiés pour l'hémoglobine, le fibrinogène et l'albumine (Tableau 7). Par contre, il apparaissait un taux de réticulocytes (en %) plus élevé chez les patients sans ulcère (Tableau 7)

Tableau 7. Comparaison des paramètres biologiques des patients drépanocytaires avec (LU+) et sans (LU-) ulcère sans les patients récemment transfusés

	LU+ n=5	LU- n=53
Hémoglobine (g/dL)	10.9 ± 0.8	9.2 ± 1.5*
VGM (fl)	104.6 ± 20.8	92.6 ± 14.0
Globules Blancs (G/L)	7.4 ± 2.3	6.9 ± 2.7
Neutrophiles (G/L)	4.6 ± 2.5	4.0 ± 2.3
Eosinophiles (G/L)	0.11 ± 0.06	0.15 ± 16
Basophiles (G/L)	0.03 ± 0.15	0.08 ± 0.13
Monocytes (G/L)	0.91 ± 0.28	0.68 ± 0.60
Lymphocytes (G/L)	1.7 ± 0.6	2.2 ± 0.9
Plaquettes (G/L)	430 ± 191	377 ± 251
Réticulocytes (G/L)	141 ± 38	162 ± 47
Réticulocytes (%)	4.8 ± 0.8	7.2 ± 3.8**
D Dimères (ng/L)	1569 ± 903	2222 ± 1397
Temps de Prothrombine (sec)	12.0 ± 0.9	13.3 ± 2.3
Ratio TCA	0.99 ± 0.11	0.96 ± 0.11
Fibrinogène (g/L)	4.6 ± 1.0	3.1 ± 1.0**
Activité de la protéine C (%)	95.4 ± 15.1	83.9 ± 14.6
Antigène libre de la protéine S (%)	77.8 ± 35.6	83.9 ± 14.6
Créatinine (µmol/L)	67.0 ± 30.6	55.3 ± 15.5
Albumine (g/L)	36.6 ± 4.3	43.9 ± 4.0***
Préalbumine (g/L)	0.19 ± 0.05	0.22 ± 0.06
LDH (UI/L)	387 ± 74.5	445 ± 132
ASAT (UI/L)	64.4 ± 54.2	45.4 ± 18.0
Bilirubine totale (µmol/L)	23.8 ± 8.4	36.6 ± 19.2
Haptoglobine (g/L)	0.15 ± 0.21	0.09 ± 0.23
Ferritine (ng/mL)	352 ± 559	263 ± 229
CRP (mg/L)	15.1 ± 19.2	10.2 ± 26.9

Valeurs présentées en moyenne ± écart type. Abréviations: LU, ulcère de jambe; VGM, volume globulaire moyen ; CCMH, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ; TCA, temps de céphaline activée, LDH, lactate dehydrogenase; ASAT, aspartate amino transférase ; CRP, C réactive protéine. Différence significative: *p<0.05, ***p<0.001

2. Thromboélastographie (ROTEM)

La thromboélastographie n'a pas montré de différence entre les 2 groupes de patients (Tableau 8) quelque soit la méthode/réactif utilisée. Les patients transfusés récemment (<4 mois ; ainsi que les patients sous anticoagulants ont été exclus de cette analyse, comme ces 2 paramètres peuvent avoir influencés les résultats. Les données étaient manquantes chez 6 patients sans ulcère.

Tableau 8. Comparaison des paramètres de thromboélastographie des patients drépanocytaires avec (LU+) et sans (LU-) ulcère

	LU+ n=7	LU- n=42
EXTEM		
CT (secondes)	64.7 ± 6.3	66.2 ± 7.6
A5	49.1 ± 13.5	50.2 ± 10.9
A20	64.0 ± 11.3	63.3 ± 8.0
Angle α (degrés)	75.0 ± 6.8	75.1 ± 6.0
MCF (mm)	65.0 ± 10.2	64.7 ± 8.2
TEMACT		
LOT (secondes)	520 ± 273	424 ± 249
LT (secondes)	1001 ± 382	766 ± 391
NATEM		
CT (secondes)	289 ± 108	365 ± 90
A5	48.0 ± 10.2	48.4 ± 8.9
A20	61.0 ± 9.6	64.9 ± 7.5
Angle α (degrés)	73.7 ± 4.9	72.5 ± 5.7
MCF (mm)	64.4 ± 7.0	65.3 ± 7.3
FIBTEM		
CT (secondes)	61.9 ± 5.8	64.6 ± 7.1
A5	20.0 ± 5.9	20.5 ± 9.3
A20	22.7 ± 6.7	21.4 ± 9.7
Angle α (degrés)	73.9 ± 5.3	73.3 ± 5.8
MCF (mm)	22.7 ± 6.7	22.8 ± 10.1

Valeurs présentées en moyenne ± écart type. Abréviations: LU, Ulcère de jambe; CT, temps de formation du caillot; A5, amplitude à 5 minutes; A20, amplitude à 20 minutes; MCF, fermeté maximale du caillot; LT, temps de lyse; LOT, temps de début de lyse.

3. Hémorhéologie

En excluant les 7 patients avec transfusion récente (<4 mois), il n'y avait pas de différence pour les paramètres hémorhéologiques à l'exception d'une plus grande déformabilité des GRs mesurée en hypoxie chez les patients du groupe ulcère (p 0.018, Tableau 9).

Tableau 9. Comparaison des paramètres hémorhéologiques des patients drépanocytaires avec (LU+) et sans (LU-) ulcère sans les patients récemment transfusés

	LU+ sans transfusion n=5	LU- sans transfusion n=51
Hématocrite (%)	30.7 ± 4.0	29.2 ± 4.5
Rapport hématocrite/viscosité (a.u.)	5.8 ± 0.4	5.6 ± 0.7
Viscosité sanguine (cP; 45 s ⁻¹)	6.5 ± 1.0	6.4 ± 1.6
Viscosité sanguine (cP; 90 s ⁻¹)	5.9 ± 0.7	5.8 ± 1.2
Viscosité sanguine (cP; 225 s ⁻¹)	5.3 ± 0.5	5.3 ± 0.9
EI max (a.u.)	0.48 ± 0.07	0.41 ± 0.10
EI min (a.u.)	0.24 ± 0.14	0.13 ± 0.09*
Point de falciformation (PO ₂ in mmHg)	37.1 ± 23.6	41.3 ± 16.6
Index d'agrégation des GRs (%)	71.4 ± 8.2	64.6 ± 12.0
Seuil de désagrégation des GRs (s ⁻¹)	604 ± 252	504 ± 254

Valeurs présentées en moyenne ± écart type. Abréviations: LU, ulcère de jambe; EI, index d'élongation; GRs, globules rouges ; cP, centi poise. Différence significative: *p<0.05. Données manquantes pour 2 patients sans ulcère.

Objectif 3 : Analyse plasma et exsudat

Le 3^e objectif de cette thèse était de décrire le contenu du plasma et de l'exsudat des patients des patients en fonction de la présence ou non d'un ulcère et de son évolution.

1. Analyse du plasma selon le statut ulcère initial

Pour le 3^e objectif, la quantification protéique n'a pas montré de différence pour les cytokines (TNF- α , IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15), VEGF-A, les métallo protéinases (MMP-1, MMP-3 and MMP-9) et TIMP-1 (Figure 64). Les valeurs de MMP-8 étaient en dessous des seuils de détection. Les résultats sont marqués par des écarts types très importants ; certaines des protéines étaient totalement absentes parfois.

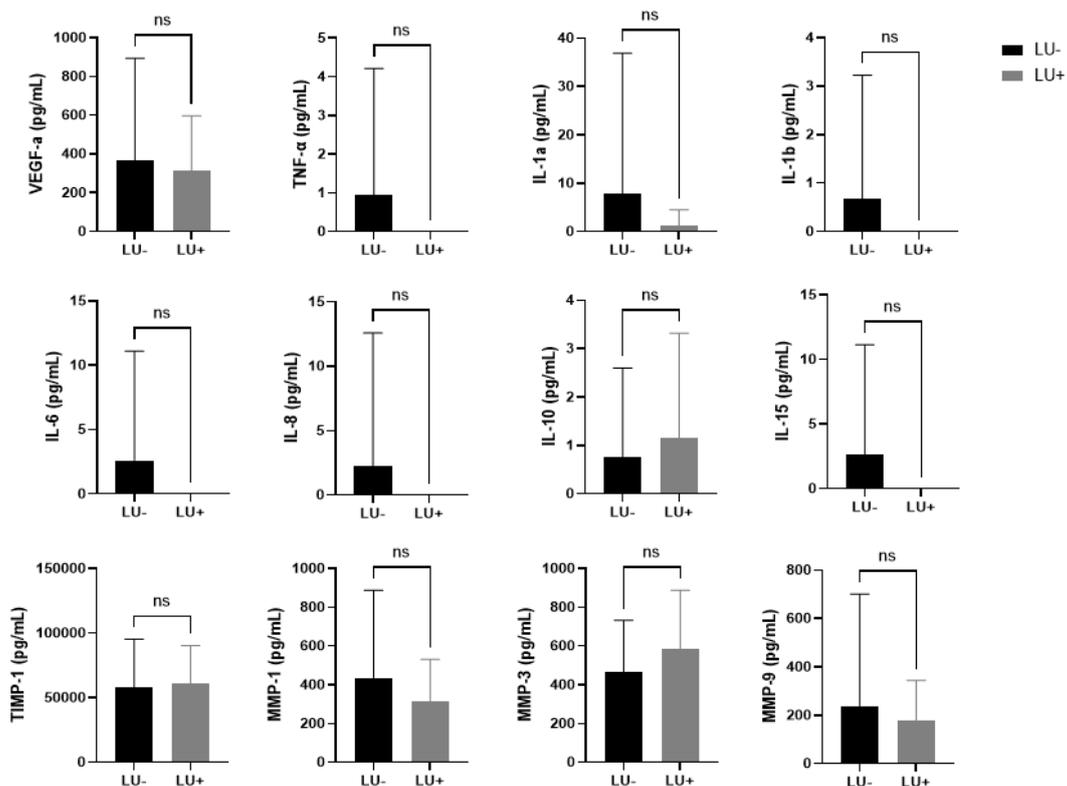


Figure 64 : Les marqueurs de cicatrisation chez 49 patients drépanocytaires sans ulcères et 9 patients drépanocytaires avec ulcères. Les analyses n'ont pas été faites sur les 7 derniers patients sans ulcères inclus.

2. Effet du plasma de patients sur des cellules endothéliales en culture

Nous avons ensuite souhaité évaluer l'effet du plasma de patients incubé avec des cellules endothéliales saines. Il n'a pas été trouvé de différence d'expression de l'ARNm de la eNOS, de COX-1 et -2, de VCAM et de e-selectine dans les cellules endothéliales incubées avec du plasma de patients avec ulcère par rapport aux cellules endothéliales incubées avec le plasma de patient sans ulcère (Figure 65A).

L'analyse des protéines par Western Blot montre qu'il n'y avait pas de différence des rapports P-eNOS/eNOS et P-ERK/ERK entre les cellules endothéliales incubées avec les 2 types de plasma (Figure 65B).

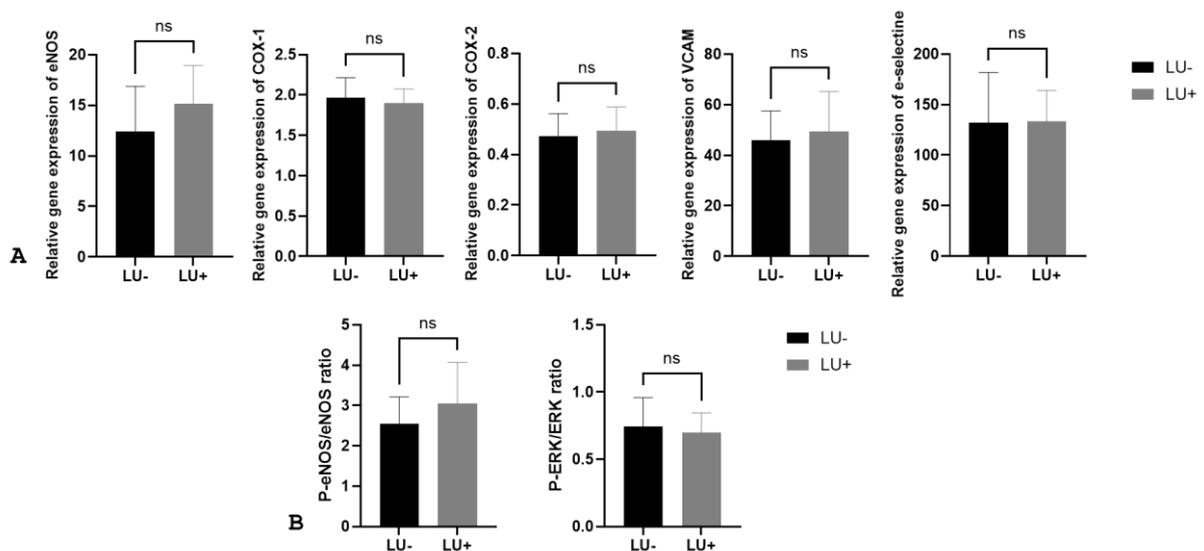


Figure 65. A. Expression de l'ARNm par des cellules endothéliales (HDMEC) incubées avec du plasma de 10 patients sans ulcère (LU-) et 8 patients avec ulcère (LU+), déterminée par PCR quantitative. L'expression est rapportée à la TATA-box binding protein. ns, non significatif

B. Ratio eNOS phosphorylée/eNOS ratio et ERK phosphorylée/ERK déterminée sur des cellules endothéliales incubées avec le plasma de 11 patients avec ulcère (LU+) et 8 patients sans ulcère (LU-). ns, non significatif

3. Analyse des exsudats selon l'évolution de l'ulcère

Parmi les 9 patients avec ulcères, 8 ont pu être suivis et 6 ont cicatrisés.

L'objectif 3 prévoyait également l'analyse des exsudats des patients avec ulcère.

Les résultats des analyses sur les exsudats sont rapportés en fonction de la cicatrisation au terme du suivi (Tableau 10). Il n'a pas été possible de réaliser de comparaison statistique étant donné le faible

nombre de patients n'ayant pas cicatrisé, pour savoir si certains marqueurs sont associés à la cicatrisation.

Les résultats sont marqués par des écarts types très importants ; certaines des protéines étaient totalement absentes parfois.

Tableau 10. Mesures par MULTIPLEX des cytokines, VEGF-a et métalloprotéases.

	LU+ suivi, non cicatrisé n=2	LU+ suivi et cicatrisé n=6
VEGF-A (pg/mL)	637 ± 334	1751 ± 1713
TNF α (pg/mL)	5.7 ± 3.8	4.7 ± 3.0
IL1 α (pg/mL)	28.9 ± 6.7	58.7 ± 42.3
IL1 β (pg/mL)	934 ± 784	1878 ± 1693
IL6 (pg/mL)	4 904 ± 5 250	3 944 ± 4 503
IL8 (pg/mL)	15 908 ± 6013	6 172 ± 8 292
IL10 (pg/mL)	1.45 ± 1.32	1.6 ± 1.4
IL15 (pg/mL)	2.60 ± 2.04	2.6 ± 4.4
TIMP1 (pg/mL)	19 447 ± 11 618	22 924 ± 26 959
MMP1 (pg/mL)	1 002 ± 974	963 ± 1387
Rapport MMP1/TIMP1	0.003 ± 0.003	0.009 ± 0.01
MMP3 (pg/mL)	437 ± 302	5 524 ± 7 913
MMP8 (pg/mL)	9201 ± 13 061	11 250 ± 11 120
MMP9 (pg/mL)	1 661 ± 1481	2 470 ± 1 623

Valeurs présentées en moyenne \pm écart type. Abréviations : VEGF, Facteur de croissance endothélial vasculaire ; IL, Interleukine, TIMP, inhibiteur tissulaire des métalloprotéases, MMP, métalloprotéases de la matrice

Objectif 4 : suivi des patients

Le 4^e objectif de cette thèse était de rechercher des facteurs expliquant cette variabilité de délai de cicatrisation. Pour cela, l'ensemble des analyses initiales ont été refaites à 6 mois chez les patients avec ulcère avec notamment l'hémolyse, la rhéologie, la coagulation et la microcirculation. Les données étaient analysées 1) en comparant l'état basal en fonction de l'évolution clinique, 2) en comparant l'état basal à l'état après cicatrisation et 3) l'état après cicatrisation à celui des patients sans ulcères.

Parmi les 9 patients avec ulcère actif, 8 patients ont pu être suivis à 6 mois (Figure 47). Le temps moyen entre l'inclusion et la seconde visite était de 8.6 ± 4.7 mois. Certaines secondes visites ont dû être retardées en raison de crises vaso occlusives intercurrentes, pour obtenir à nouveau un état clinique stable.

A la seconde visite, 6 patients étaient cicatrisés (LU+ suivi et cicatrisé) avec un délai moyen de cicatrisation de 4.4 ± 2.5 mois. Les 2 autres patients restants (LU+ toujours actif) ont tout de même vu leur taille d'ulcère réduire : pour un patient la taille est passée de 6.3 cm^2 à 3.1 cm^2 alors que l'autre patient avait 3 ulcères qui sont passés de 21.2 cm^2 à 7.9 cm^2 pour le 1^{er} ulcère, 27.5 cm^2 à 16.5 cm^2 pour le 2^e ulcère et 5 cm^2 à 5.5 cm^2 pour le 3^e ulcère.

1. Comparaison initiale des patients en fonction de la cicatrisation obtenue en 6 mois

Parmi les 8 patients suivis, à leur visite d'inclusion, la taille moyenne des ulcères était de $5.7 \pm 4.8 \text{ cm}^2$ pour les patients qui ont cicatrisé et $20.7 \pm 9.6 \text{ cm}^2$ pour les 2 patients qui n'ont pas cicatrisé. La durée moyenne depuis l'apparition de la plaie et la visite d'inclusion était de 4.6 ± 4.8 mois pour les patients qui ont cicatrisé et 15.0 ± 6.0 mois pour les 2 autres patients qui n'ont pas cicatrisé.

Les 2 patients qui n'ont pas cicatrisé étaient traités par Voxelotor. Les 6 autres patients ayant cicatrisés étaient traités par Hydroxyurée, à l'exception d'un patient qui recevait l'association Hydroxyurée et Voxelotor.

La TcPO₂ moyenne au 1^{er} espace inter métatarsien était $57 \pm 7 \text{ mmHg}$ pour les 6 patients qui ont cicatrisé et $42 \pm 9 \text{ mmHg}$ pour les 2 autres patients qui n'ont pas cicatrisé.

2. Comparaison des patients cicatrisés entre les 2 visites

Pour connaître l'évolution avec la cicatrisation, nous avons effectué la comparaison des données initiales des patients ayant cicatrisés à leurs données après cicatrisation. Il n'y avait pas de différence pour la biologie de routine et biochimie (Tableau 11).

Tableau 11 Comparaison des paramètres biologiques standards entre les 6 patients drépanocytaires avec ulcère actif à leur visite initiale puis après cicatrisation

	LU+ actif 6	LU+ suivi et cicatrisé 6
Hémoglobine (g/dL)	10.6 ± 1.0	10.6 ± 1.9
VGM (fl)	108.8 ± 16.0	101.4 ± 12.2
CCMH (g/100mL)	339.7 ± 3.2	348.7 ± 13.1
Globules Blancs (G/L)	8.7 ± 3.1	7.9 ± 1.9
Neutrophiles (G/L)	6.5 ± 2.2	4.2 ± 1.0
Eosinophiles (G/L)	0.17 ± 0.16	0.11 ± 0.04
Basophiles (G/L)	0.04 ± 0.03	0.04 ± 0.02
Monocytes (G/L)	1.1 ± 0.5	1.0 ± 0.3
Lymphocytes (G/L)	1.6 ± 0.6	1.9 ± 0.7
Plaquettes (G/L)	387 ± 136	356 ± 119
Réticulocytes (G/L)	159 ± 43	188 ± 21
Réticulocytes (%)	9.3 ± 4.8	11.4 ± 4.4
D Dimères (ng/L)	2 198 ± 2 789	1 548 ± 1 082
Temps de Prothrombine (sec)	13.2 ± 2.1	13.2 ± 1.8
Ratio TCA	1.02 ± 0.07	0.97 ± 0.10
Fibrinogène (g/L)	3.4 ± 0.9	3.1 ± 0.7
Activité de la protéine C (%)	78.3 ± 12.8	73.8 ± 14.7*
Antigène libre de la protéine S (%)	72.0 ± 32.2	68.0 ± 29.3
Créatinine (µmol/L)	62.3 ± 28.6	58.8 ± 23.5
Albumine (g/L)	39.0 ± 5.2	39.8 ± 4.2
Pré albumine (g/L)	0.20 ± 0.05	0.19 ± 0.03
LDH (UI/L)	425 ± 104	465 ± 211
ASAT (UI/L)	52.0 ± 19.2	49.7 ± 11.9
Bilirubine totale (µmol/L)	67.2 ± 38.1	76.6 ± 45.4
Haptoglobine (g/L)	0.04 ± 0.03	0.03 ± 0.0
Ferritine (ng/mL)	291 ± 232	261 ± 245
C réactive protéine (mg/L)	6.2 ± 4.4	7.2 ± 5.9

Valeurs présentées en moyenne ± écart type. Abréviations: LU, ulcère de jambe; VGM, volume globulaire moyen; CCMH, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine; TCA, temps de céphaline activée, LDH, lactate déshydrogénase; ASAT, aspartate amino transférase. Différence significative: *p<0.05, ***p<0.001

Nous avons comparé les mesures microcirculatoires entre la visite d'inclusion (lorsque l'ulcère était actif) et la seconde visite (après cicatrisation de l'ulcère). La TcPO2 moyenne au 1er espace inter métatarsien était plus élevée après cicatrisation (64 ± 7 mmHg et 74 ± 4 mmHg, p 0.037).

La vasodilatation cutanée en réponse à l'acétylcholine, au courant et au chauffage local était meilleure après cicatrisation (p 0.004, p 0.0013 and p 0.003, respectivement) (Figure 66).

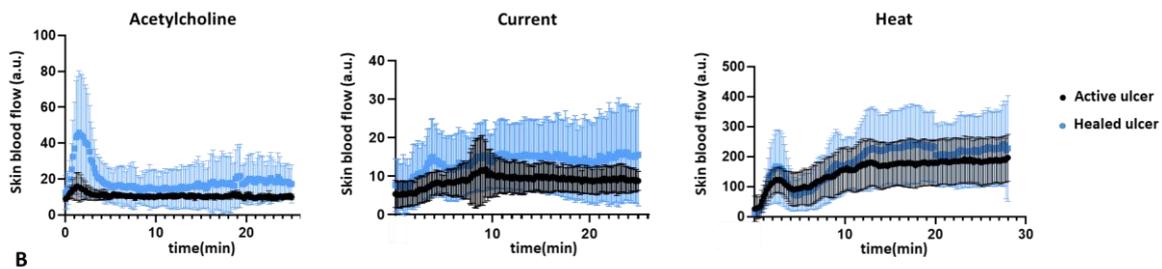


Figure 66 : Flux sanguin cutané des patients drépanocytaires. La courbe représente la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne. Le flux sanguin est exprimé en unité arbitraire (a.u.). Comparaison des patients avec ulcère actif à leur visite initiale (active ulcer, $n=6$) et après cicatrisation (healed ulcer, $n=6$) en réponse à l'acétylcholine, au courant et au chauffage local. Toutes les réponses sont significativement différentes après cicatrisation (p 0.004, p 0.0013 and p 0.003 respectivement, Wilcoxon matched-pairs test)

3. Comparaison des patients cicatrisés avec les patients sans ulcère

Pour savoir si la cicatrisation permet de retourner à l'état basal ou si l'altération de la microcirculation persiste après la cicatrisation, les données microcirculatoires des patients cicatrisés ont été comparées avec celles de patients n'ayant eu d'ulcère.

La vasodilatation cutanée en réponse à l'acétylcholine, au courant et au chauffage local était meilleure chez les patients ayant cicatrisés par rapport aux patients n'ayant jamais eu de plaies (p <0.001 , p 0.001 and p <0.001 , respectivement) (Figure 65).

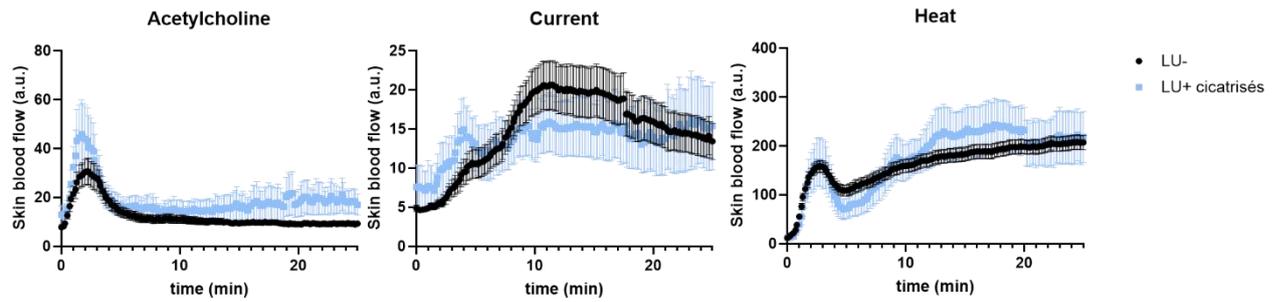


Figure 67 : Flux sanguin cutané des patients drépanocytaires. La courbe représente la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne. Le flux LU+ cicatrisesés, n=6) et des patients n'ayant jamais eu d'ulcère (LU-, n=53) en réponse à l'acétylcholine, au courant et au chauffage local. Toutes les réponses sont significativement différentes après cicatrisation ($p < 0.001$, $p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectivement, test de Mann Whitney).

Discussion

Avant tout, cette étude m'a permis de mieux appréhender l'histoire naturelle des ulcères des patients drépanocytaires. Les patients rapportaient bien un phénomène douloureux local avant l'apparition de la plaie, compatible avec la théorie d'un phénomène vaso occlusif local entraînant une ischémie cutanée. Certaines plaies semblaient davantage en lien avec une station prolongée en position debout avec réouverture d'une cicatrice fibreuse par un œdème mal contrôlé. Comme décrit dans la littérature, il s'agit bien de plaies très douloureuses et il est souvent nécessaire de réaliser une anesthésie locale par topique avant la détersion. Pour la même raison, les pansements trop adhérents au retrait ne sont pas acceptés par les patients. J'ai appris à adapter les pansements, à la fois, à l'aspect de la plaie mais également aux ressentis du patient. J'ai pu observer une cicatrisation relativement rapide chez la majorité des patients inclus avec ulcère (4,4 mois en moyenne), alors que le délai moyen de cicatrisation d'un ulcère veineux est de 6 mois dans la littérature (582).

Il est important de souligner que les patients inclus dans cette étude ont bénéficié de l'expertise du centre de référence des pathologies du globule rouge de l'Hôpital Edouard Herriot. Leur traitement médicamenteux était déjà optimisé au mieux avec les paramètres biologiques de leur drépanocytose pour réduire au maximum le nombre de CVO ; cela a probablement participé à leur meilleur pronostic de cicatrisation. Par ailleurs, les patients inclus avaient une surface moyenne d'ulcère plutôt faible en comparaison à celle rapportée dans la cohorte parisienne de P. Senet (307).

De manière intéressante, la cicatrisation était bien prédite par les critères pronostiques de cicatrisation des patients drépanocytaires d'une cohorte française rapportée par Senet et al. (307). Dans cette étude, les ulcères ayant cicatrisé avaient une surface moyenne moindre ($< 8 \text{ cm}^2$) et une durée d'évolution moindre depuis leur apparition (< 9 semaines) (307). Mener ce travail m'a permis d'entrer en contact avec Caterina Minniti, experte mondiale de la drépanocytose et de partager nos expériences. Elle soutient qu'au bout d'un certain temps d'évolution chez un patient qui a reçu des soins adaptés (au moins 1 à 2 ans), il faut probablement accepter que le patient ne cicatrise pas et adapter la prise en charge et notamment le délai entre les rendez-vous de suivi en plaie et cicatrisation pour ne pas emboliser inutilement cette consultation et mettre en place un protocole pansement « long terme ». Ceci laisse à penser que suivre plus longtemps nos patients n'aurait pas modifié le statut de cicatrisation.

Chez les 2 patients n'ayant pas cicatrisé, il se discute un gain secondaire (583,584). En effet, l'absence de cicatrisation permet de maintenir l'état « visiblement malade » et donc la sollicitude des proches

et l'arrêt de travail. Également, elle justifie la poursuite de la prescription d'antalgiques morphiniques et de MEOPA (mélange équimolaire d'oxygène et protoxyde d'azote), qui peuvent avoir entraîné une dépendance. Le patient peut retarder la cicatrisation par un mauvais contrôle de l'œdème, d'une part, en ne portant pas la compression veineuse et d'autre part, en ne respectant pas les consignes de surélévation des jambes. Une bonne partie de ces considérations sont probablement propres aux pays avec un système social et de santé aussi riche que celui de la France.

Il existe plusieurs niveaux d'intérêt à la compréhension de la physiopathologie des ulcères de jambe des patients drépanocytaires :

- (1) Savoir quels patients drépanocytaires sont à risque de souffrir d'ulcères de jambe n'a de l'intérêt que s'il existe un moyen de prévenir la survenue de ces ulcères : optimiser encore d'avantage le traitement médicamenteux et comment ? port de la compression veineuse systématique ?

Le lien entre l'insuffisance veineuse et les ulcères des patients drépanocytaires n'est pas clair tout comme la raison pour laquelle les patients drépanocytaires développent un œdème après l'apparition de l'ulcère.

- (2) Comprendre ce qui explique le retard de cicatrisation pour le limiter ; pour autant dans notre cohorte Drepano2 le temps de cicatrisation est bien plus rapide que ce qui est rapporté dans la littérature (75% des patients cicatrisés à 6 mois dans notre cohorte contre 47% dans la cohorte parisienne rapportée par Senet et al.(307)) . Il y a probablement lieu de se féliciter autant sur la prise en charge médicale de la drépanocytose que sur la prise en charge locale de la plaie qui ont certainement concouru à ce résultat.

Il est important d'éduquer au mieux les patients drépanocytaires sur l'ulcère de jambe : que faire en cas d'apparition d'ulcère ? que faire en cas de douleur aiguë à la cheville faisant évoquer la survenue proche d'un ulcère ? Cette éducation pourrait être plus efficace si elle ciblait un nombre restreint de patients (les plus à risque).

Le résultat principal de cette étude concerne la microcirculation. C'est la première fois que la microcirculation cutanée a été évaluée chez les patients drépanocytaires en fonction de la présence ou non d'un ulcère de jambe. Nous avons montré que la microcirculation cutanée des patients

drépanocytaires avec ulcère avait une capacité à vasodilater moindre que celle des patients drépanocytaires sans ulcère.

La baisse de la réponse à l'acétylcholine, au courant et à la chaleur s'expliquerait par une atteinte de l'ensemble des voies de la vasodilatation :

- Une altération du contrôle nerveux, cohérente avec le déficit sensitif mis en évidence sur les tests de sensibilité cutanée au froid et au chaud. Des neuropathies périphériques infra clinique seraient présentes chez 20% des patients drépanocytaires (585). Cela s'expliquerait par des caractéristiques favorisant une neuropathie périphérique trouvées chez la souris drépanocytaire, comme une gaine de myéline plus fine (586) ; mais il n'y a pas d'étude d'association avec les autres complications de la drépanocytose.
- Une altération de la vasodilatation endothélium dépendante médiée par la COX et la voie du NO (575,577–579).

Pour le NO, Les mécanismes de diminution de la biodisponibilité dans la drépanocytose sont bien connus (diminution des substrats, capture du NO par l'hémoglobine libre et transformations en dérivés nitrés oxydés). Par contre pour la COX, il a été rapporté que l'activité COX est augmentée chez la souris drépanocytaire (587) ainsi que dans les neutrophiles des patients drépanocytaires, du fait du stress oxydant (588).

Toutefois, nous avons bien pris en compte que la pertinence de ces résultats est limitée ; ils doivent être reproduits sur une plus grande cohorte, ce qui est difficile vu l'incidence de cette complication chez les patients drépanocytaires. En effet, les courbes de microcirculation différaient en analysant l'ensemble des points de manière groupée (représentant 187 points par courbe) alors que l'analyse des aires sous la courbe, des valeurs et pourcentage de pic et du plateau n'ont pas montré de différence (les valeurs de p étaient proches de la significativité pour les p aux pics, données non rapportées). Ceci peut s'expliquer par un nombre insuffisant de patient inclus.

De plus, nous n'avons pas été autorisé à réaliser de iontophorèse en utilisant le nitroprussiate de sodium (SNP) qui aurait permis d'évaluer la vasodilatation non médiée par l'endothélium (participation des muscles lisses en réponse au NO) (588). La réalisation des tests de microcirculation et de TcPO2 prenait 60 minutes et il n'était pas possible de rallonger la consultation, les patients drépanocytaires étant déjà très sollicités sur le plan clinique.

Cliniquement, le mécanisme de retard de cicatrisation semble proche de celui des ulcères veineux. Chez le patient insuffisant veineux (insuffisance veineuse superficielle isolée), en position allongée, il était observé une vasodilatation moindre au SNP en position allongée et à l'acétylcholine en position

debout par rapport aux contrôles (590). Par la suite, il a été montré que le traitement de l'insuffisance veineuse par ligature de la jonction saphéno fémorale et stripping (enlever chirurgicalement la veine), améliore la vasodilatation indépendante de l'endothélium (analysée avec le SNP) mais pas la vasodilatation dépendante de l'endothélium (analysée avec l'acétylcholine) (591), ce qui est étonnant puisqu'on s'attendrait à un effet principal via la diminution de la contrainte de cisaillement et donc une moindre activation de l'endothélium. Il n'y a pas de données sur l'analyse de la microcirculation par iontophorèse des patients au stade d'ulcère veineux, comparé à des contrôles. Toutefois, il a été montré une amélioration de la vasodilatation en réponse à l'ACh et au SNP après 3 mois d'exercice chez 38 patients avec ulcère veineux, du côté de la jambe avec ulcère (592). Comme il n'y a pas toujours de varice à traiter chez les patients drépanocytaires, ces études soutiennent l'intérêt de favoriser l'exercice physique chez des patients avec ulcère. Toutefois, ces patients sont souvent limités par la douleur.

Pour creuser le mécanisme de l'atteinte microcirculatoire, nous avons incubé des cellules HDMEC avec du plasma de patient avec et sans ulcère pour mesurer la présence des COX et eNOS. La comparaison avec les 9 patients avec ulcère initialement actif n'a pas permis de mettre une évidence de différence dans l'expression de l'ARNm de COX-1, COX-2 et eNOS. Nous n'avons pas non plus observé de différence pour le ratio P-eNOS/eNOS (possible manque de puissance lors de l'analyse des 9 ulcères actifs).

La comparaison de l'état microcirculatoire chez les patients avec ulcères actifs puis après cicatrisation a montré une amélioration. Afin de répondre à la question : l'amélioration est-elle secondaire à la cicatrisation ou permet-elle la cicatrisation, les données microcirculatoires des patients avec ulcères cicatrisés ont été comparées à celle des patients qui n'ont jamais eu d'ulcère. Il s'avère que les valeurs deviennent meilleures chez les patients cicatrisés que chez ceux n'ayant jamais eu d'ulcère. L'hypothèse est que cette amélioration est temporaire, entraînée par l'inflammation (593) ; il faudrait pouvoir recomparer à distance de la cicatrisation (6 à 12 mois).

Par dosages des cytokines chez les patients avec ulcères veineux avant et après compression veineuse (494), il a été observé une amélioration de l'état inflammatoire post-compression. Il serait très intéressant d'analyser les fonctions microvasculaires cutanées avant et après le port de la compression veineuse. En effet, il a été rapporté que la compression diminue la contrainte de cisaillement et diminue les cytokines pro inflammatoires plasmatiques (494). On s'attendrait à observer une amélioration de la vasodilatation dépendante de l'endothélium (en réponse à l'acétylcholine, au courant et lors de la phase plateau en réponse au chauffage). Toutefois, cela nécessiterait d'être très

réactif après l'apparition d'un ulcère car la compression est rapidement mise en place par le patient ou par son médecin.

Nos résultats ont montré que la valeur moyenne de TcPO₂ au 1^{er} espace inter métatarsien était plus faible chez les patients avec ulcères par rapport aux patients sans ulcères, en l'absence d'artériopathie des membres inférieurs (à l'exception d'un patient avec ulcère). La valeur moyenne de la TcPO₂ rapportée dans le groupe sans ulcère était proche de la normale (594). Il n'existe pas de données dans la littérature sur la valeur « normale » chez le patient drépanocytaire. L'œdème des membres inférieurs ne peut pas être tenu pour responsable de cette différence ; une précédente étude avait montré que le traitement des œdèmes ne modifiait pas la valeur de la TcPO₂ (595). La chute de la TcPO₂ est probablement expliquée par une consommation de l'O₂ par l'ulcère et par une insuffisance microcirculatoire ; la TcPO₂ des patients cicatrisés étant entre celle des patients avec ulcère actif et celle des patients sans ulcère.

D'autres études étudiant la fonction vasculaire seront nécessaires pour confirmer ces observations et identifier les mécanismes potentiellement impliqués dans cette dysfonction vasculaire.

Les études précédentes ont montré une corrélation positive entre la présence d'ulcères et la réduction de l'albumine chez les drépanocytaires (256), tout comme dans les populations non drépanocytaires (596). Toutefois, dans notre étude, la valeur d'albumine pour les patients avec ulcère restait dans les valeurs de la normale (597). Les données ne permettent pas de savoir si la baisse de l'albumine précède l'apparition de l'ulcère ou si elle est la conséquence de l'apparition de l'ulcère, lors de la tentative de cicatrisation. Dans un cas comme dans l'autre, il pourrait donc être intéressant de mettre en place une supplémentation nutritionnelle de manière systématique devant un ulcère chez un patient drépanocytaire, y compris si l'albumine reste dans les limites de la normale. Il n'y avait pas de différence pour ce qui est du poids et de l'indice de masse corporelle entre les 2 groupes, tout comme dans les études précédentes (248,256).

Nous avons été étonnés de ne pas retrouver les caractéristiques des patients drépanocytaires avec ulcères habituellement décrites. Il est maintenant bien admis que les ulcères de jambe correspondent au phénotype hémolytique de la drépanocytose (140,246,249,256,598–600). Pour autant, nous n'avons pas trouvé de stigmates d'hémolyse plus importants chez les patients avec ulcère et même à l'inverse, une hémoglobine plus élevée chez les patients avec ulcères. Ces résultats étaient confirmés après exclusion des patients transfusés dans les 3 derniers mois. La seule explication est le fait que

tous les patients étaient traités par un traitement modificateur de la maladie (principalement l'hydroxyurée), ce qui aurait gommé l'hémolyse (hématocrite autour de 29-30% chez les patients inclus contre 25% dans la littérature (127)). Également, il y avait davantage de patients traités par Voxelotor dans le groupe ulcère. Le Voxelotor inhibe la polymérisation de l'HbS, ce qui permet de réduire l'hémolyse et l'anémie (601). Dans les études précédentes, moins de la moitié (248,256,598) ou aucun patient ne recevait de traitement par hydroxyurée (140,246,599,600). La différence dans le pourcentage de patients traités par hydroxyurée et l'introduction du Voxelotor pourrait expliquer, au moins en partie, la différence de phénotype biologique entre les études. Par contre, pour ce qui est du phénotype clinique, il y a bien été observé une moindre fréquence des CVOs dans le groupe ulcère. Il n'y avait aucune hypertension pulmonaire dans aucun des groupes et pas de différence pour la fréquence du priapisme. Cela interroge sur le fait qu'en limitant l'hémolyse, les ulcères drépanocytaires surviennent toujours, et donc que l'hémolyse n'est qu'un des facteurs favorisant des ulcères des patients drépanocytaires

Alors que les neutrophiles et le fibrinogène étaient plus élevés dans le groupe ulcère, nous n'avons pas observé de différence dans les marqueurs inflammatoires cytokiniques entre les patients avec et sans ulcère. Cela pourrait s'expliquer par le port quasi systématique de compression veineuse chez les patients avec ulcère de notre étude, une pierre fondamentale du traitement (347,494).

Etonnamment, la déformabilité des GRs, mesurée à faible pression en O₂, était diminuée chez les patients sans ulcères par rapport aux patients avec ulcère. Les précédentes études rapportaient une plus faible déformabilité des GRs en conditions normoxiques chez les patients avec ulcères (164,275) mais c'est la première fois que la déformabilité des GRs en conditions hypoxiques est comparée entre les patients avec et sans ulcère. De plus, notre étude incluait principalement des patients avec ulcère actif, à l'inverse des précédentes études hémorhéologiques qui incluaient principalement des patients sans traitement par hydroxyurée (164,275) et/ou avec une histoire d'ulcère de jambe mais sans ulcère actif (140). Cela rend difficile la comparaison des résultats hémorhéologiques et d'hémolyse, de notre étude avec ceux des études précédentes. Alors que la déformabilité des GRs est diminuée chez les patients drépanocytaires, il a été proposé qu'une plus grande déformabilité augmenterait l'adhésion des GRs aux cellules endothéliales, déclenchant une occlusion de la microcirculation (4) et potentiellement une activation des cellules endothéliales, participant à la moindre vasodilatation endothélium-dépendante que nous avons observés en laser doppler fluxmétrie.

Nous n'avons pu inclure qu'un petit nombre de patients avec ulcère actif, du fait de l'incidence de la maladie, mais nous avons réussi à suivre la quasi-totalité des patients sur 6 mois pour obtenir des

nouvelles mesures de la fonction microcirculatoire. Parmi ces 8 patients suivis, 6 ont cicatrisé. Nous avons observé que la cicatrisation était associée avec une augmentation de la TcPO₂ au 1^{er} espace inter métatarsien. Ce résultat serait consistant avec l'hypothèse qui veut que la TcPO₂ reflète l'oxygène délivrée par les vaisseaux à laquelle on soustrait l'oxygène consommée localement par la plaie (602). Toutefois, les résultats rapportés dans notre étude seraient concordant avec une autre hypothèse qui est l'augmentation de la valeur de TcPO₂ liée à l'amélioration des capacités microcirculatoires après la cicatrisation. En effet, une meilleure vasodilatation en réponse aux stimuli impliquerait un meilleur transport d'oxygène jusqu'au site de la plaie.

Enfin, l'analyse comparative des exsudats comme facteur prédicteur de la cicatrisation n'a pas été possible en raison du faible nombre de patients n'ayant pas cicatrisé. Ce taux de cicatrisation à 6 mois devrait amener à inclure uniquement les patients à mauvais pronostic de cicatrisation dans des études thérapeutiques à l'avenir (> 8 cm² et > 9 semaines d'évolution).

L'étude a des limites. La limite principale est le petit nombre de patients avec ulcères inclus, du fait d'une faible incidence des ulcères de jambe actifs dans notre centre.

Certaines caractéristiques étaient différentes entre les patients avec et sans ulcère, ce qui a pu introduire des facteurs confondants dans l'interprétation des résultats. Les patients avec ulcères étaient plus âgés. Ceci s'explique par le fait que les patients sans ulcères plus âgés étaient moins susceptibles en raison d'un manque de temps, d'un manque d'intérêt pour la compensation financière et d'un nombre de prise de sang déjà perçu comme trop important pour leur suivi médical. Nous n'avons donc pas pu faire correspondre les groupes en termes d'âge. L'âge impacte le système vasculaire dans la population générale (603,604) et l'on pourrait donc suspecter un effet de l'âge sur l'altération de la vasodilatation microcirculatoire dans le groupe des patients avec ulcère. Toutefois, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre les différents marqueurs de la fonction microcirculatoire et l'âge dans notre étude. La perte de la capacité à vasodilater dans la microcirculation des patients drépanocytaires est précoce (560). L'âge a probablement participé à la progression de la vasculopathie mais il est difficile d'isoler son effet dans le contexte de la drépanocytose, où l'hémolyse chronique, l'inflammation et le stress oxydant sont également impliqués dans la détérioration de la fonction vasculaire.

Nous avons également observé un taux plus élevé d'événements thromboemboliques veineux chez les patients avec ulcères. Nous ne savons pas s'ils ont pu affecter la réactivité micro vasculaire mais tous les épisodes ont eu lieu plus de 3 mois avant l'inclusion. A l'inverse, la plus haute proportion d'œdème

chez les patients avec ulcère a pu augmenter la contrainte de cisaillement locale et activation les cellules endothéliales (539).

Enfin, il y avait un déséquilibre sur la dose d'HU qui était plus élevée chez les patients sans ulcère, ce qui a pu affecter l'activation endothéliale. Il a été montré que la dilatation micro vasculaire cutanée est plus importante chez les patients traités par HU par rapport à ceux ne recevant pas ce traitement (605). Il est donc possible que l'HU minimise la différence de réactivité micro vasculaire entre les 2 groupes.

Conclusion et Perspectives

L'analyse de la littérature autour des ulcères de jambe des patients drépanocytaires ainsi que l'expérience clinique avec les patients m'a permis de proposer et publier une revue contenant un modèle physiopathologique inédit (**Catella et al. BJHaem 2024**). L'apparition de l'ulcère est secondaire à une crise vaso occlusive locale sous cutanée entraînant un phénomène ischémique. Puis, la veinostase retarde la cicatrisation et favorise les récives. Il en découle que la prévention des ulcères drépanocytaires passe majoritairement par la prise en charge la plus optimale et la plus précoce de la drépanocytose pour limiter les stigmates de l'hémolyse et la sévérité de la vasculopathie. Il faudrait tenter de traiter précocement les ulcères avant leur apparition comme on traiterait une CVO : hydratation, oxygénothérapie et antalgique pour voir si l'on peut diminuer la survenue d'une brèche cutanée. Ensuite, si la plaie apparaît, le traitement est celui d'un ulcère veineux avec comme pierre angulaire, la compression veineuse et la surélévation du membre inférieur. Enfin, la récive doit pouvoir être limitée par la poursuite du port de la compression veineuse au long cours, y compris en l'absence d'œdème permanent.

Nous avons mis en évidence une altération plus importante de la fonction microcirculatoire chez les patients drépanocytaires avec ulcère de jambe. Les données dont nous disposons ne nous permettent pas de savoir si l'atteinte microcirculatoire que nous avons mis en évidence est secondaire à la présence de l'ulcère ou si elle précède l'apparition du premier ulcère et fait le lit de la CVO cutanée. Il serait nécessaire d'obtenir des données microcirculatoires à distance de la cicatrisation (6-12 mois) mais cela semble difficile à obtenir en raison du taux important de récives, qui peuvent être secondaires à une nouvelle vaso occlusion et ischémie locale ou à la réouverture d'une cicatrice d'un précédent ulcère par des phénomènes plus proches de l'ulcère veineux (œdème, augmentation de la contrainte de cisaillement, inflammation puis destruction locale par les MMPs). Les cultures cellulaires laissent supposer que nous avons écarté certaines pistes concernant le mécanisme d'altération de la microcirculation mais le nombre réduit d'échantillon a pu limiter nos résultats. Ces résultats sont présentés sous forme d'article accepté dans **Br J Haematol**.

A l'avenir, des tests sur un modèle murin de drépanocytose SS (308) permettraient de tester la microcirculation avant et après création de la plaie puis de manière isolée, les voies du NO et de la COX à l'aide d'inhibiteurs spécifiques. Également, il faudrait pouvoir analyser l'effet des traitements modificateurs de la maladie (hydroxyurée, voxelotor) et de la transfusion sur les données microcirculatoires du modèle murin.

Bibliographie

1. Cho YI, Cho DJ. Hemorheology and microvascular disorders. *Korean Circ J.* 2011 Jun;41(6):287–95.
2. Tsai AG, Acero C, Nance PR, Cabrales P, Frangos JA, Buerk DG, et al. Elevated plasma viscosity in extreme hemodilution increases perivascular nitric oxide concentration and microvascular perfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Apr;288(4):H1730-1739.
3. Baskurt OK, Boynard M, Cokelet GC, Connes P, Cooke BM, Forconi S, et al. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2009;42(2):75–97.
4. Connes P, Alexy T, Detterich J, Romana M, Hardy-Dessources MD, Ballas SK. The role of blood rheology in sickle cell disease. *Blood Rev.* 2016 Mar;30(2):111–8.
5. Baskurt OK, Yalcin O, Meiselman HJ. Hemorheology and vascular control mechanisms. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2004;30(3–4):169–78.
6. Thurston GB, Henderson NM. Effects of flow geometry on blood viscoelasticity. *Biorheology.* 2006;43(6):729–46.
7. Vent-Schmidt J, Waltz X, Romana M, Hardy-Dessources MD, Lemonne N, Billaud M, et al. Blood thixotropy in patients with sickle cell anaemia: role of haematocrit and red blood cell rheological properties. *PLoS One.* 2014;9(12):e114412.
8. Baskurt OK, Meiselman HJ. Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost.* 2003 Oct;29(5):435–50.
9. Késmárky G, Kenyeres P, Rábai M, Tóth K. Plasma viscosity: a forgotten variable. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008;39(1–4):243–6.
10. Dzierzak E, Philipsen S. Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Apr 1;3(4):a011601.
11. Kuhn V, Diederich L, Keller TCS, Kramer CM, Lückstädt W, Panknin C, et al. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxid Redox Signal.* 2017 May 1;26(13):718–42.
12. Meiselman HJ, Neu B, Rampling MW, Baskurt OK. RBC aggregation: laboratory data and models. *Indian J Exp Biol.* 2007 Jan;45(1):9–17.
13. Gondelaud F, Connes P, Nader E, Renoux C, Fort R, Gauthier A, et al. Sialic acids rather than glycosaminoglycans affect normal and sickle red blood cell rheology by binding to four major sites on fibrinogen. *Am J Hematol.* 2020 Apr;95(4):E77–80.
14. Nader E, Nougier C, Boisson C, Poutrel S, Catella J, Martin F, et al. Increased blood viscosity and red blood cell aggregation in patients with COVID-19. *Am J Hematol.* 2022 Mar 1;97(3):283–92.

15. Baskurt OK, Meiselman HJ. RBC aggregation: more important than RBC adhesion to endothelial cells as a determinant of in vivo blood flow in health and disease. *Microcirculation*. 2008 Oct;15(7):585–90.
16. Renoux C, Faivre M, Bessaa A, Da Costa L, Joly P, Gauthier A, et al. Impact of surface-area-to-volume ratio, internal viscosity and membrane viscoelasticity on red blood cell deformability measured in isotonic condition. *Sci Rep*. 2019 May 1;9(1):6771.
17. Fischer TM, Haest CW, Stöhr M, Kamp D, Deuticke B. Selective alteration of erythrocyte deformability by SH-reagents: evidence for an involvement of spectrin in membrane shear elasticity. *Biochim Biophys Acta*. 1978 Jul 4;510(2):270–82.
18. Lanotte L, Mauer J, Mendez S, Fedosov DA, Fromental JM, Claveria V, et al. Red cells' dynamic morphologies govern blood shear thinning under microcirculatory flow conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Nov 22;113(47):13289–94.
19. Bellingham AJ, Detter JC, Lenfant C. Regulatory mechanisms of hemoglobin oxygen affinity in acidosis and alkalosis. *J Clin Invest*. 1971 Mar;50(3):700–6.
20. Hess W. Affinity of oxygen for hemoglobin--its significance under physiological and pathological conditions. *Anaesthetist*. 1987 Sep;36(9):455–67.
21. Key NS, Derebail VK. Sickle-cell trait: novel clinical significance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:418–22.
22. Skinner SC, Diaw M, Pialoux V, Mbaye MN, Mury P, Lopez P, et al. Increased Prevalence of Type 2 Diabetes-Related Complications in Combined Type 2 Diabetes and Sickle Cell Trait. *Diabetes Care*. 2018 Dec;41(12):2595–602.
23. Hannemann A, Weiss E, Rees DC, Dalibalta S, Ellory JC, Gibson JS. The Properties of Red Blood Cells from Patients Heterozygous for HbS and HbC (HbSC Genotype). *Anemia*. 2011;2011:248527.
24. Adachi K, Kim J, Ballas S, Surrey S, Asakura T. Facilitation of Hb S polymerization by the substitution of Glu for Gln at beta 121. *J Biol Chem*. 1988 Apr 25;263(12):5607–10.
25. Zimmerman SA, O'Branski EE, Rosse WF, Ware RE. Hemoglobin S/O(Arab): thirteen new cases and review of the literature. *Am J Hematol*. 1999 Apr;60(4):279–84.
26. Knox-Macaulay HHM, Ahmed MM, Gravell D, Al-Kindi S, Ganesh A. Sickle cell-haemoglobin E (HbSE) compound heterozygosity: a clinical and haematological study. *Int J Lab Hematol*. 2007 Aug;29(4):292–301.
27. Pauling L, Itano HA. Sickle cell anemia a molecular disease. *Science*. 1949 Nov 25;110(2865):543–8.
28. Goldstein J, Konigsberg W, Hill RJ. The structure of human hemoglobin. VI. The sequence of amino acids in the tryptic peptides of the beta chain. *J Biol Chem*. 1963 Jun;238:2016–27.
29. Allison AC. Protection Afforded by Sickle-cell Trait Against Subtertian Malarial Infection. *Br Med J*. 1954 Feb 6;1(4857):290–4.

30. Ayi K, Turrini F, Piga A, Arese P. Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. *Blood*. 2004 Nov 15;104(10):3364–71.
31. Griffiths MJ, Ndungu F, Baird KL, Muller DP, Marsh K, Newton CR. Oxidative stress and erythrocyte damage in Kenyan children with severe Plasmodium falciparum malaria. *Br J Haematol*. 2001 May;113(2):486–91.
32. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *Lancet*. 2013 Jan 12;381(9861):142–51.
33. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Mar 15;4(1):1–22.
34. Ferrone FA. The delay time in sickle cell disease after 40 years: A paradigm assessed. *Am J Hematol*. 2015 May;90(5):438–45.
35. Eaton WA, Hofrichter J. Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. *Blood*. 1987 Nov;70(5):1245–66.
36. Lu L, Li X, Vekilov PG, Karniadakis GE. Probing the Twisted Structure of Sickle Hemoglobin Fibers via Particle Simulations. *Biophys J*. 2016 May 10;110(9):2085–93.
37. Seakins M, Gibbs WN, Milner PF, Bertles JF. Erythrocyte Hb-S concentration. An important factor in the low oxygen affinity of blood in sickle cell anemia. *J Clin Invest*. 1973 Feb;52(2):422–32.
38. Rogers SC, Ross JGC, d'Avignon A, Gibbons LB, Gazit V, Hassan MN, et al. Sickle hemoglobin disturbs normal coupling among erythrocyte O₂ content, glycolysis, and antioxidant capacity. *Blood*. 2013 Feb 28;121(9):1651–62.
39. Brugnara C, Bunn HF, Tosteson DC. Regulation of erythrocyte cation and water content in sickle cell anemia. *Science*. 1986 Apr 18;232(4748):388–90.
40. Hannemann A, Rees DC, Tewari S, Gibson JS. Cation Homeostasis in Red Cells From Patients With Sickle Cell Disease Heterologous for HbS and HbC (HbSC Genotype). *EBioMedicine*. 2015 Nov;2(11):1669–76.
41. Kuypers FA. Hemoglobin s polymerization and red cell membrane changes. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014 Apr;28(2):155–79.
42. Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001 Jan 12;276(2):1071–7.
43. Chirico EN, Pialoux V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life*. 2012;64(1):72–80.
44. Franco RS. Measurement of red cell lifespan and aging. *Transfus Med Hemother*. 2012 Oct;39(5):302–7.

45. Goodman SR. The irreversibly sickled cell: a perspective. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2004 Feb;50(1):53–8.
46. Lang E, Qadri SM, Lang F. Killing me softly - suicidal erythrocyte death. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 Aug;44(8):1236–43.
47. Burger P, Hilarius-Stokman P, de Korte D, van den Berg TK, van Bruggen R. CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood*. 2012 Jun 7;119(23):5512–21.
48. Brugnara C, de Franceschi L, Alper SL. Inhibition of Ca(2+)-dependent K⁺ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest*. 1993 Jul;92(1):520–6.
49. Huber SM, Uhlemann AC, Gamper NL, Duranton C, Kremsner PG, Lang F. Plasmodium falciparum activates endogenous Cl⁻ channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *EMBO J*. 2002 Jan 15;21(1–2):22–30.
50. Nguyen DB, Wagner-Britz L, Maia S, Steffen P, Wagner C, Kaestner L, et al. Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells. *Cell Physiol Biochem*. 2011;28(5):847–56.
51. Westerman M, Porter JB. Red blood cell-derived microparticles: An overview. *Blood Cells Mol Dis*. 2016 Jul;59:134–9.
52. Bennett V. Proteins involved in membrane--cytoskeleton association in human erythrocytes: spectrin, ankyrin, and band 3. *Methods Enzymol*. 1983;96:313–24.
53. Orf K, Cunningham AJ. Infection-related hemolysis and susceptibility to Gram-negative bacterial co-infection. *Front Microbiol*. 2015;6:666.
54. Santiago RP, Guarda CC, Figueiredo CVB, Fiuza LM, Aleluia MM, Adanho CSA, et al. Serum haptoglobin and hemopexin levels are depleted in pediatric sickle cell disease patients. *Blood Cells Mol Dis*. 2018 Sep;72:34–6.
55. Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Abdulla F, Zhang P, Nguyen H, et al. Haptoglobin and hemopexin inhibit vaso-occlusion and inflammation in murine sickle cell disease: Role of heme oxygenase-1 induction. *PLoS One*. 2018;13(4):e0196455.
56. Nur E, Biemond BJ, Otten HM, Brandjes DP, Schnog JJB, CURAMA Study Group. Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. *Am J Hematol*. 2011 Jun;86(6):484–9.
57. Vona R, Sposi NM, Mattia L, Gambardella L, Straface E, Pietraforte D. Sickle Cell Disease: Role of Oxidative Stress and Antioxidant Therapy. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Feb 16;10(2):296.
58. Schmidt HM, Wood KC, Lewis SE, Hahn SA, Williams XM, McMahon B, et al. Xanthine Oxidase Drives Hemolysis and Vascular Malfunction in Sickle Cell Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021 Feb;41(2):769–82.
59. Gwozdziński K, Pieniasek A, Gwozdziński L. Reactive Oxygen Species and Their Involvement in Red Blood Cell Damage in Chronic Kidney Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:6639199.

60. Beetsch JW, Park TS, Dugan LL, Shah AR, Gidday JM. Xanthine oxidase-derived superoxide causes reoxygenation injury of ischemic cerebral endothelial cells. *Brain Res.* 1998 Mar 9;786(1–2):89–95.
61. Voskou S, Aslan M, Fanis P, Phylactides M, Kleantous M. Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease. *Redox Biol.* 2015 Dec;6:226–39.
62. Baskurt OK, Temiz A, Meiselman HJ. Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. *Free Radic Biol Med.* 1998 Jan 1;24(1):102–10.
63. Hierso R, Waltz X, Mora P, Romana M, Lemonne N, Connes P, et al. Effects of oxidative stress on red blood cell rheology in sickle cell patients. *Br J Haematol.* 2014 Aug;166(4):601–6.
64. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47–95.
65. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000 Nov 10;87(10):840–4.
66. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta.* 2013 May;1830(5):3289–303.
67. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002;30(6):620–50.
68. Perrella MA, Yet SF. Role of heme oxygenase-1 in cardiovascular function. *Curr Pharm Des.* 2003;9(30):2479–87.
69. Manfredini V, Lazzaretti LL, Griebeler IH, Santin AP, Brandão VDM, Wagner S, et al. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. *J Natl Med Assoc.* 2008 Aug;100(8):897–902.
70. Hasanato RMW. Zinc and antioxidant vitamin deficiency in patients with severe sickle cell anemia. *Ann Saudi Med.* 2006;26(1):17–21.
71. Hebbel RP. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest.* 1997 Dec 1;100(11 Suppl):S83–86.
72. Vinchi F, Tolosano E. Therapeutic approaches to limit hemolysis-driven endothelial dysfunction: scavenging free heme to preserve vasculature homeostasis. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:396527.
73. Setty BNY, Betal SG. Microvascular endothelial cells express a phosphatidylserine receptor: a functionally active receptor for phosphatidylserine-positive erythrocytes. *Blood.* 2008 Jan 15;111(2):905–14.
74. Piccin A, Murphy C, Eakins E, Kunde J, Corvetta D, Di Pierro A, et al. Circulating microparticles, protein C, free protein S and endothelial vascular markers in children with sickle cell anaemia. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:28414.
75. Camus SM, De Moraes JA, Bonnin P, Abbyad P, Le Jeune S, Lionnet F, et al. Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. *Blood.* 2015 Jun 11;125(24):3805–14.

76. Nader E, Romana M, Guillot N, Fort R, Stauffer E, Lemonne N, et al. Association Between Nitric Oxide, Oxidative Stress, Eryptosis, Red Blood Cell Microparticles, and Vascular Function in Sickle Cell Anemia. *Front Immunol.* 2020;11:551441.
77. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 2007 May;21(3):157–71.
78. Ardoin SP, Shanahan JC, Pisetsky DS. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand J Immunol.* 2007;66(2–3):159–65.
79. Owens AP, Mackman N. Microparticles in Hemostasis and Thrombosis. *Circ Res.* 2011 May 13;108(10):1284–97.
80. Hebbel RP. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest.* 1997 Jun 1;99(11):2561–4.
81. Wautier JL, Wautier MP. Cellular and Molecular Aspects of Blood Cell-Endothelium Interactions in Vascular Disorders. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 27;21(15):5315.
82. Sugihara K, Sugihara T, Mohandas N, Hebbel RP. Thrombospondin mediates adherence of CD36+ sickle reticulocytes to endothelial cells. *Blood.* 1992 Nov 15;80(10):2634–42.
83. Zhang D, Xu C, Manwani D, Frenette PS. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood.* 2016 Feb 18;127(7):801–9.
84. Kaul DK, Nagel RL, Chen D, Tsai HM. Sickle erythrocyte-endothelial interactions in microcirculation: the role of von Willebrand factor and implications for vasoocclusion. *Blood.* 1993 May 1;81(9):2429–38.
85. Noubouossie D, Key NS, Ataga KI. Coagulation abnormalities of sickle cell disease: Relationship with clinical outcomes and the effect of disease modifying therapies. *Blood Rev.* 2016 Jul;30(4):245–56.
86. Yee DL, Edwards RM, Mueller BU, Teruya J. Thromboelastographic and hemostatic characteristics in pediatric patients with sickle cell disease. *Arch Pathol Lab Med.* 2005 Jun;129(6):760–5.
87. Sparkenbaugh EM, Chantrathammachart P, Wang S, Jonas W, Kirchhofer D, Gailani D, et al. Excess of heme induces tissue factor-dependent activation of coagulation in mice. *Haematologica.* 2015 Mar;100(3):308–14.
88. Solovey A, Kollander R, Milbauer LC, Abdulla F, Chen Y, Kelm RJ, et al. Endothelial nitric oxide synthase and nitric oxide regulate endothelial tissue factor expression in vivo in the sickle transgenic mouse. *Am J Hematol.* 2010 Jan;85(1):41–5.
89. Brousse V, Buffet P, Rees D. The spleen and sickle cell disease: the sick(led) spleen. *Br J Haematol.* 2014 Jul;166(2):165–76.
90. Tomer A, Harker LA, Kasey S, Eckman JR. Thrombogenesis in sickle cell disease. *J Lab Clin Med.* 2001 Jun;137(6):398–407.

91. Villagra J, Shiva S, Hunter LA, Machado RF, Gladwin MT, Kato GJ. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood*. 2007 Sep 15;110(6):2166–72.
92. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Aug;68(16):2667–88.
93. Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond)*. 2013 Apr;124(7):423–41.
94. Lane PA, O’Connell JL, Marlar RA. Erythrocyte membrane vesicles and irreversibly sickled cells bind protein S. *Am J Hematol*. 1994 Dec;47(4):295–300.
95. el-Hazmi MA, Warsy AS, Bahakim H. Blood proteins C and S in sickle cell disease. *Acta Haematol*. 1993;90(3):114–9.
96. Hofstra TC, Kalra VK, Meiselman HJ, Coates TD. Sick erythrocytes adhere to polymorphonuclear neutrophils and activate the neutrophil respiratory burst. *Blood*. 1996 May 15;87(10):4440–7.
97. Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 5;99(5):3047–51.
98. Telen MJ. Cellular adhesion and the endothelium: E-selectin, L-selectin, and pan-selectin inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014 Apr;28(2):341–54.
99. Canalli AA, Franco-Penteado CF, Saad STO, Conran N, Costa FF. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. *Haematologica*. 2008 Apr;93(4):605–9.
100. Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Milbauer L, Abdulla F, Alayash AI, et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood*. 2014 Jan 16;123(3):377–90.
101. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011 Feb;30(1):16–34.
102. Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest*. 2017 Mar 1;127(3):750–60.
103. Gladwin MT, Ofori-Acquah SF. Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. *Blood*. 2014 Jun 12;123(24):3689–90.
104. Li T, Zhang Z, Li X, Dong G, Zhang M, Xu Z, et al. Neutrophil Extracellular Traps: Signaling Properties and Disease Relevance. *Mediators Inflamm*. 2020;2020:9254087.
105. Qari MH, Dier U, Mousa SA. Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2012;18(2):195–200.
106. Li J, Yin Q, Wu H. Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily. *Adv Immunol*. 2013;119:135–53.

107. Keikhaei B, Mohseni AR, Norouzirad R, Alinejadi M, Ghanbari S, Shiravi F, et al. Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. *Eur Cytokine Netw.* 2013 Mar;24(1):45–52.
108. Nebor D, Bowers A, Hardy-Dessources MD, Knight-Madden J, Romana M, Reid H, et al. Frequency of pain crises in sickle cell anemia and its relationship with the sympatho-vagal balance, blood viscosity and inflammation. *Haematologica.* 2011 Nov;96(11):1589–94.
109. Sangkatumvong S, Coates TD, Khoo MCK. Abnormal autonomic cardiac response to transient hypoxia in sickle cell anemia. *Physiol Meas.* 2008 May;29(5):655–68.
110. Charlot K, Hierso R, Lemonne N, Romana M, Tressières B, Lalanne-Mistrih ML, et al. Changes in autonomic nervous activity during vaso-occlusive crisis in patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2017 May;177(3):484–6.
111. Wenzel RR, Rütthemann J, Bruck H, Schäfers RF, Michel MC, Philipp T. Endothelin-A receptor antagonist inhibits angiotensin II and noradrenaline in man. *Br J Clin Pharmacol.* 2001 Aug;52(2):151–7.
112. Gras E, Belaidi E, Briançon-Marjollet A, Pépin JL, Arnaud C, Godin-Ribuot D. Endothelin-1 mediates intermittent hypoxia-induced inflammatory vascular remodeling through HIF-1 activation. *J Appl Physiol (1985).* 2016 Feb 15;120(4):437–43.
113. Werdehoff SG, Moore RB, Hoff CJ, Fillingim E, Hackman AM. Elevated plasma endothelin-1 levels in sickle cell anemia: relationships to oxygen saturation and left ventricular hypertrophy. *Am J Hematol.* 1998 Jul;58(3):195–9.
114. Ergul S, Brunson CY, Hutchinson J, Tawfik A, Kutlar A, Webb RC, et al. Vasoactive factors in sickle cell disease: in vitro evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction. *Am J Hematol.* 2004 Jul;76(3):245–51.
115. Rybicki AC, Benjamin LJ. Increased levels of endothelin-1 in plasma of sickle cell anemia patients. *Blood.* 1998 Oct 1;92(7):2594–6.
116. Rivera A, Jarolim P, Brugnara C. Modulation of Gardos channel activity by cytokines in sickle erythrocytes. *Blood.* 2002 Jan 1;99(1):357–603.
117. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, Schechter AN, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med.* 2002 Dec;8(12):1383–9.
118. Gladwin MT, Lancaster JR, Freeman BA, Schechter AN. Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat Med.* 2003 May;9(5):496–500.
119. Mack AK, Kato GJ. Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(8):1237–43.
120. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA.* 2005 Jul 6;294(1):81–90.

121. Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Vichinsky EP, Styles LA. Patterns of arginine and nitric oxide in patients with sickle cell disease with vaso-occlusive crisis and acute chest syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2000;22(6):515–20.
122. Rasmusen C, Cynober L, Couderc R. Arginine and statins: relationship between the nitric oxide pathway and the atherosclerosis development. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2005;63(5):443–55.
123. Landburg PP, Teerlink T, Biemond BJ, Brandjes DPM, Muskiet FAJ, Duits AJ, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in sickle cell disease are related to the hemolytic phenotype. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2010 Apr 15;44(4):229–32.
124. Gupta P, Kumar R. Nitric oxide: A potential etiological agent for vaso-occlusive crises in sickle cell disease. *Nitric Oxide*. 2024 Mar 1;144:40–6.
125. Gladwin MT, Grubina R, Doyle MP. The new chemical biology of nitrite reactions with hemoglobin: R-state catalysis, oxidative denitrosylation, and nitrite reductase/anhydrase. *Acc Chem Res*. 2009 Jan 20;42(1):157–67.
126. Salhany JM. Reaction of nitrite with human fetal oxyhemoglobin: a model simulation study with implications for blood flow regulation in sickle cell disease (SCD). *Blood Cells Mol Dis*. 2010;44(2):111–4.
127. Tripette J, Alexy T, Hardy-Dessources MD, Mougengel D, Beltan E, Chalabi T, et al. Red blood cell aggregation, aggregate strength and oxygen transport potential of blood are abnormal in both homozygous sickle cell anemia and sickle-hemoglobin C disease. *Haematologica*. 2009 Aug;94(8):1060–5.
128. Chien S, Usami S, Bertles JF. Abnormal rheology of oxygenated blood in sickle cell anemia. *J Clin Invest*. 1970 Apr;49(4):623–34.
129. Vent-Schmidt J, Waltz X, Pichon A, Hardy-Dessources MD, Romana M, Connes P. Indirect viscosimetric method is less accurate than ektacytometry for the measurement of red blood cell deformability. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2015;59(2):115–21.
130. Renoux C, Parrow N, Faes C, Joly P, Hardeman M, Tisdale J, et al. Importance of methodological standardization for the ektacytometric measures of red blood cell deformability in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2016;62(2):173–9.
131. Lemonne N, Lamarre Y, Romana M, Mukisi-Mukaza M, Hardy-Dessources MD, Tarer V, et al. Does increased red blood cell deformability raise the risk for osteonecrosis in sickle cell anemia? *Blood*. 2013 Apr 11;121(15):3054–6.
132. Lamarre Y, Romana M, Waltz X, Lalanne-Mistrih ML, Tressières B, Divialle-Doumdo L, et al. Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease. *Haematologica*. 2012 Nov;97(11):1641–7.
133. Boisson C, Nader E, Renoux C, Gauthier A, Poutrel S, Bertrand Y, et al. Shear-Stress-Gradient and Oxygen-Gradient Ektacytometry in Sickle Cell Patients at Steady State and during Vaso-Occlusive Crises. *Cells*. 2022 Feb 8;11(3):585.
134. Connes P, Lamarre Y, Waltz X, Ballas SK, Lemonne N, Etienne-Julan M, et al. Haemolysis and abnormal haemorheology in sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*. 2014;165(4):564–72.

135. Makani J, Cox SE, Soka D, Komba AN, Oruo J, Mwamtemi H, et al. Mortality in sickle cell anemia in Africa: a prospective cohort study in Tanzania. *PLoS One*. 2011 Feb 16;6(2):e14699.
136. Gardner K, Douiri A, Drasar E, Allman M, Mwirigi A, Awogbade M, et al. Survival in adults with sickle cell disease in a high-income setting. *Blood*. 2016 Sep 8;128(10):1436–8.
137. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*. 2007 Jan;21(1):37–47.
138. Hamideh D, Raj V, Harrington T, Li H, Margolles E, Amole F, et al. Albuminuria correlates with hemolysis and NAG and KIM-1 in patients with sickle cell anemia. *Pediatr Nephrol*. 2014 Oct;29(10):1997–2003.
139. Bernaudin F, Arnaud C, Kamdem A, Hau I, Lelong F, Epaud R, et al. Biological impact of α genes, β haplotypes, and G6PD activity in sickle cell anemia at baseline and with hydroxyurea. *Blood Adv*. 2018 Mar 27;2(6):626–37.
140. Connes P, Lamarre Y, Hardy-Dessources MD, Lemonne N, Waltz X, Mouguel D, et al. Decreased Hematocrit-To-Viscosity Ratio and Increased Lactate Dehydrogenase Level in Patients with Sickle Cell Anemia and Recurrent Leg Ulcers. *PLoS One*. 2013 Nov 4;8(11):e79680.
141. Ballas SK, Larner J, Smith ED, Surrey S, Schwartz E, Rappaport EF. Rheologic predictors of the severity of the painful sickle cell crisis. *Blood*. 1988 Oct;72(4):1216–23.
142. Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, et al. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2004 Feb 26;350(9):886–95.
143. Humbert M, Kovacs G, Hoeper MM, Badagliacca R, Berger RMF, Brida M, et al. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J*. 2022 Oct 11;43(38):3618–731.
144. Miller AC, Gladwin MT. Pulmonary complications of sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Jun 1;185(11):1154–65.
145. Kort F, Habibi A, Lionnet F, Carette MF, Parrot A, Savale L, et al. Diffuse cystic lung disease in sickle cell anaemia: a series of 22 cases and a case-control study. *Thorax*. 2022 Jan;77(1):91–3.
146. Pereira DA, Calmasini FB, Costa FF, Burnett AL, Silva FH. Nitric Oxide Resistance in Priapism Associated with Sickle Cell Disease: Mechanisms, Therapeutic Challenges, and Future Directions. *J Pharmacol Exp Ther*. 2024 Jul 18;390(2):203–12.
147. Olujohungbe AB, Adeyoju A, Yardumian A, Akinyanju O, Morris J, Westerdale N, et al. A prospective diary study of stuttering priapism in adolescents and young men with sickle cell anemia: report of an international randomized control trial--the priapism in sickle cell study. *J Androl*. 2011;32(4):375–82.
148. Mantadakis E, Ewalt DH, Cavender JD, Rogers ZR, Buchanan GR. Outpatient penile aspiration and epinephrine irrigation for young patients with sickle cell anemia and prolonged priapism. *Blood*. 2000 Jan 1;95(1):78–82.
149. Brousse V, Rees DC. Sickle cell disease: More than a century of progress. Where do we stand now? *Indian J Med Res*. 2021 Jul;154(1):4–7.

150. Connes P, Verlhac S, Bernaudin F. Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2013 May;161(4):484–98.
151. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood*. 1998 Jan 1;91(1):288–94.
152. DeBaun MR, Kirkham FJ. Central nervous system complications and management in sickle cell disease. *Blood*. 2016 Feb 18;127(7):829–38.
153. Jordan LC, King AA, Kanter J, Lebensburger J, Ford AL, Varughese TE, et al. Incidence and Risk Factors for New and Recurrent Infarcts in Adults With Sickle Cell Disease. *J Am Heart Assoc*. 2024 Jun 18;13(12):e033278.
154. Dobson SR, Holden KR, Nietert PJ, Cure JK, Laver JH, Disco D, et al. Moyamoya syndrome in childhood sickle cell disease: a predictive factor for recurrent cerebrovascular events. *Blood*. 2002 May 1;99(9):3144–50.
155. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med*. 1998 Jul 2;339(1):5–11.
156. Sachdev V, Rosing DR, Thein SL. Cardiovascular complications of sickle cell disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2021 Apr;31(3):187–93.
157. Gladwin MT. Cardiovascular complications in patients with sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017 Dec 8;2017(1):423–30.
158. Gbotosho OT, Taylor M, Malik P. Cardiac pathophysiology in sickle cell disease. *J Thromb Thrombolysis*. 2021 Jul;52(1):248–59.
159. Hostetter TH. Hyperfiltration and glomerulosclerosis. *Semin Nephrol*. 2003 Mar;23(2):194–9.
160. Falk RJ, Scheinman J, Phillips G, Orringer E, Johnson A, Jennette JC. Prevalence and pathologic features of sickle cell nephropathy and response to inhibition of angiotensin-converting enzyme. *N Engl J Med*. 1992 Apr 2;326(14):910–5.
161. Ballas SK. Pathophysiology and principles of management of the many faces of the acute vaso-occlusive crisis in patients with sickle cell disease. *Eur J Haematol*. 2015 Aug;95(2):113–23.
162. Ballas SK, Gupta K, Adams-Graves P. Sickle cell pain: a critical reappraisal. *Blood*. 2012 Nov 1;120(18):3647–56.
163. Ballas SK, Lief S, Benjamin LJ, Dampier CD, Heeney MM, Hoppe C, et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2010 Jan;85(1):6–13.
164. Ballas SK, Smith ED. Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis. *Blood*. 1992 Apr 15;79(8):2154–63.
165. Lapoumeroulie C, Connes P, El Hoss S, Hierso R, Charlot K, Lemonne N, et al. New insights into red cell rheology and adhesion in patients with sickle cell anaemia during vaso-occlusive crises. *Br J Haematol*. 2019 Jun;185(5):991–4.

166. Charlot K, Romana M, Moeckesch B, Jumet S, Waltz X, Divialle-Doumbo L, et al. Which side of the balance determines the frequency of vaso-occlusive crises in children with sickle cell anemia: Blood viscosity or microvascular dysfunction? *Blood Cells Mol Dis*. 2016 Jan;56(1):41–5.
167. Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, et al. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. *N Engl J Med*. 2000 Jun 22;342(25):1855–65.
168. Vichinsky EP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O, Nickerson B. Acute chest syndrome in sickle cell disease: clinical presentation and course. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*. 1997 Mar 1;89(5):1787–92.
169. Adesina OO, Neumayr LD. Osteonecrosis in sickle cell disease: an update on risk factors, diagnosis, and management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2019 Dec 6;2019(1):351–8.
170. Childs SG. Osteonecrosis: death of bone cells. *Orthop Nurs*. 2005;24(4):295–301; quiz 302–3.
171. North TE, Goessling W, Peeters M, Li P, Ceol C, Lord AM, et al. Hematopoietic stem cell development is dependent on blood flow. *Cell*. 2009 May 15;137(4):736–48.
172. Rosse WF, Narla M, Petz LD, Steinberg MH. New Views of Sickle Cell Disease Pathophysiology and Treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2000;2–17.
173. Flouzat-Lachaniete CH, Roussignol X, Poignard A, Mukasa MM, Manicom O, Hernigou P. Multifocal joint osteonecrosis in sickle cell disease. *Open Orthop J*. 2009 May 15;3:32–5.
174. Ebert EC, Nagar M, Hagspiel KD. Gastrointestinal and hepatic complications of sickle cell disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010 Jun;8(6):483–9; quiz e70.
175. Shah R, Taborda C, Chawla S. Acute and chronic hepatobiliary manifestations of sickle cell disease: A review. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2017 Aug 15;8(3):108–16.
176. Ramdath A, Zeineddin A, Nizam W, Kearse L, Olufajo OA, Williams M. Outcomes after Cholecystectomy in Patients with Sickle Cell Disease: Does Acuity of Presentation Play a Role? *J Am Coll Surg*. 2020 Jun;230(6):1020–4.
177. Fadugbagbe AO, Gurgel RQ, Mendonça CQ, Cipolotti R, dos Santos AM, Cuevas LE. Ocular manifestations of sickle cell disease. *Ann Trop Paediatr*. 2010;30(1):19–26.
178. Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin CT, Sebastiani P, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*. 2011 Jul 7;118(1):19–27.
179. Steinberg MH, Chui DHK, Dover GJ, Sebastiani P, Alsultan A. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? *Blood*. 2014 Jan 23;123(4):481–5.
180. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, et al. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med*. 1991 Jul 4;325(1):11–6.
181. Serjeant GR, Serjeant BE, Mason KP, Hambleton IR, Fisher C, Higgs DR. The changing face of homozygous sickle cell disease: 102 patients over 60 years. *Int J Lab Hematol*. 2009 Dec;31(6):585–96.

182. El-Ghamrawy M, Yassa ME, Tousson AMS, El-Hady MA, Mikhaeil E, Mohamed NB, et al. Association between BCL11A, HSB1L-MYB, and XmnI γ G-158 (C/T) gene polymorphism and hemoglobin F level in Egyptian sickle cell disease patients. *Ann Hematol.* 2020 Oct;99(10):2279–88.
183. Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2005 May;129(4):465–81.
184. Lamarre Y, Romana M, Lemonne N, Hardy-Dessources MD, Tarer V, Mougénel D, et al. Alpha thalassemia protects sickle cell anemia patients from macro-albuminuria through its effects on red blood cell rheological properties. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2014;57(1):63–72.
185. Koshy M, Entsuah R, Koranda A, Kraus AP, Johnson R, Bellvue R, et al. Leg Ulcers in Patients With Sickle Cell Disease. *Blood.* 1989 Sep 1;74(4):1403–8.
186. Joly P, Garnier N, Kebaili K, Renoux C, Dony A, Cheikh N, et al. G6PD deficiency and absence of α -thalassemia increase the risk for cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia. *Eur J Haematol.* 2016 Apr;96(4):404–8.
187. Nolan VG, Wyszynski DF, Farrer LA, Steinberg MH. Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. *Blood.* 2005 Nov 1;106(9):3264–7.
188. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004 Nov;287(5):R1014-1030.
189. Minucci A, Moradkhani K, Hwang MJ, Zuppi C, Giardina B, Capoluongo E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the “old” and update of the new mutations. *Blood Cells Mol Dis.* 2012 Mar 15;48(3):154–65.
190. Bouanga JC, Mouélé R, Préhu C, Wajcman H, Feingold J, Galactéros F. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and homozygous sickle cell disease in Congo. *Hum Hered.* 1998;48(4):192–7.
191. Powars DR, Meiselman HJ, Fisher TC, Hiti A, Johnson C. Beta-S gene cluster haplotypes modulate hematologic and hemorheologic expression in sickle cell anemia. Use in predicting clinical severity. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1994 Feb;16(1):55–61.
192. Bhagat S, Thakur AS. Influence of β -Globin Haplotypes on Oxidative Stress, Antioxidant Capacity and Inflammation in Sickle Cell Patients of Chhattisgarh. *Indian J Clin Biochem.* 2019 Apr;34(2):201–6.
193. Okumura JV, Silva DGH, Torres LS, Belini-Junior E, Barberino WM, Oliveira RG, et al. Inheritance of the Bantu/Benin haplotype causes less severe hemolytic and oxidative stress in sickle cell anemia patients treated with hydroxycarbamide. *J Hum Genet.* 2016 Jul;61(7):605–11.
194. Carvalho-dos Santos BS, Dias-Elias DB, da Silva-Rocha LB, Cavalcante-Barbosa M, Pinheiro-Gonçalves R. Impact of β (S)-globin haplotypes on oxidative stress in patients with sickle cell anemia in steady state. *Arch Med Res.* 2012 Oct;43(7):536–40.
195. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med.* 1995 May 18;332(20):1317–22.

196. Pule GD, Mowla S, Novitzky N, Wiysonge CS, Wonkam A. A systematic review of known mechanisms of hydroxyurea-induced fetal hemoglobin for treatment of sickle cell disease. *Expert Rev Hematol*. 2015 Oct;8(5):669–79.
197. Charache S, Dover GJ, Moore RD, Eckert S, Ballas SK, Koshy M, et al. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood*. 1992 May 15;79(10):2555–65.
198. Davies SC, Gilmore A. The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. *Blood Rev*. 2003 Jun;17(2):99–109.
199. Chaar V, Picot J, Renaud O, Bartolucci P, Nzouakou R, Bachir D, et al. Aggregation of mononuclear and red blood cells through an $\alpha_4\beta_1$ -Lu/basal cell adhesion molecule interaction in sickle cell disease. *Haematologica*. 2010 Nov;95(11):1841–8.
200. King SB. Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Radic Biol Med*. 2004 Sep 15;37(6):737–44.
201. Lemonne N, Charlot K, Waltz X, Ballas SK, Lamarre Y, Lee K, et al. Hydroxyurea treatment does not increase blood viscosity and improves red blood cell rheology in sickle cell anemia. *Haematologica*. 2015 Oct;100(10):e383–386.
202. Ware RE. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2010 Jul 1;115(26):5300–11.
203. Herity LB, Vaughan DM, Rodriguez LR, Lowe DK. Voxelotor: A Novel Treatment for Sickle Cell Disease. *Ann Pharmacother*. 2021 Feb;55(2):240–5.
204. Vichinsky E, Hoppe CC, Ataga KI, Ware RE, Nduba V, El-Beshlawy A, et al. A Phase 3 Randomized Trial of Voxelotor in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2019 Aug 8;381(6):509–19.
205. Han J, Molokie RE, Hussain F, Njoku F, Gordeuk VR, Saraf SL. Voxelotor and albuminuria in adults with sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2022 Jun;197(5):e63–4.
206. Barak M, Hu C, Matthews A, Fortenberry YM. Current and Future Therapeutics for Treating Patients with Sickle Cell Disease. *Cells*. 2024 May 16;13(10):848.
207. Riley TR, Boss A, McClain D, Riley TT. Review of Medication Therapy for the Prevention of Sickle Cell Crisis. *P T*. 2018 Jul;43(7):417–37.
208. Ataga KI, Kutlar A, Kanter J, Liles D, Cancado R, Friedrisch J, et al. Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2017 Feb 2;376(5):429–39.
209. Novartis provides update on Phase III STAND trial assessing crizanlizumab | Novartis [Internet]. [cited 2024 Jan 5]. Available from: <https://www.novartis.com/news/novartis-provides-update-phase-iii-stand-trial-assessing-crizanlizumab>
210. Niihara Y, Miller ST, Kanter J, Lanzkron S, Smith WR, Hsu LL, et al. A Phase 3 Trial of L-Glutamine in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2018 Jul 19;379(3):226–35.
211. Sadaf A, Quinn CT. L-glutamine for sickle cell disease: Knight or pawn? *Exp Biol Med (Maywood)*. 2020 Jan;245(2):146–54.

212. Poillon WN, Kim BC, Labotka RJ, Hicks CU, Kark JA. Antisickling effects of 2,3-diphosphoglycerate depletion. *Blood*. 1995 Jun 1;85(11):3289–96.
213. van Dijk MJ, Rab MAE, van Oirschot BA, Bos J, Derichs C, Rijneveld AW, et al. Safety and efficacy of mitapivat, an oral pyruvate kinase activator, in sickle cell disease: A phase 2, open-label study. *Am J Hematol*. 2022 Jul;97(7):E226–9.
214. Rab MAE, Kanne CK, Boisson C, Bos J, van Oirschot BA, Houwing M, et al. Oxygen gradient ektacytometry-derived biomarkers are associated with acute complications in sickle cell disease. *Blood Adv*. 2023 Nov 17;bloodadvances.2023011013.
215. Gladwin MT, Kato GJ, Weiner D, Onyekwere OC, Dampier C, Hsu L, et al. Nitric oxide for inhalation in the acute treatment of sickle cell pain crisis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2011 Mar 2;305(9):893–902.
216. Minniti CP, Gorbach AM, Xu D, Hon YY, Delaney KM, Seidel M, et al. Topical sodium nitrite for chronic leg ulcers in patients with sickle cell anaemia: a phase 1 dose-finding safety and tolerability trial. *Lancet Haematol*. 2014 Dec 1;1(3):e95–103.
217. Booth C, Inusa B, Obaro SK. Infection in sickle cell disease: a review. *Int J Infect Dis*. 2010 Jan;14(1):e2–12.
218. Marouf R. Blood transfusion in sickle cell disease. *Hemoglobin*. 2011;35(5–6):495–502.
219. Hyacinth HI, Adams RJ, Voeks JH, Hibbert JM, Gee BE. Frequent red cell transfusions reduced vascular endothelial activation and thrombogenicity in children with sickle cell anemia and high stroke risk. *Am J Hematol*. 2014 Jan;89(1):47–51.
220. Rogers ZR. Review: clinical transfusion management in sickle cell disease. *Immunohematology*. 2006;22(3):126–31.
221. Ait Abdallah N, Connes P, Di Liberto G, Offredo L, Beaumont JL, Menouche D, et al. Automated RBC Exchange has a greater effect on whole blood viscosity than manual whole blood exchange in adult patients with sickle cell disease. *Vox Sang*. 2020 Nov;115(8):722–8.
222. Chou ST, Fasano RM. Management of Patients with Sickle Cell Disease Using Transfusion Therapy: Guidelines and Complications. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2016 Jun;30(3):591–608.
223. Petz LD, Calhoun L, Shulman IA, Johnson C, Herron RM. The sickle cell hemolytic transfusion reaction syndrome. *Transfusion*. 1997 Apr;37(4):382–92.
224. Conran N, Belcher JD. Inflammation in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018;68(2–3):263–99.
225. Boga C, Kozanoglu I, Ozdogu H, Ozyurek E. Plasma exchange in critically ill patients with sickle cell disease. *Transfus Apher Sci*. 2007 Aug;37(1):17–22.
226. Locatelli F, Kabbara N, Ruggeri A, Ghavamzadeh A, Roberts I, Li CK, et al. Outcome of patients with hemoglobinopathies given either cord blood or bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling. *Blood*. 2013 Aug 8;122(6):1072–8.
227. Bernaudin F. Why, Who, When, and How? Rationale for Considering Allogeneic Stem Cell Transplantation in Children with Sickle Cell Disease. *J Clin Med*. 2019 Sep 22;8(10):1523.

228. Zaidi AU, Heeney MM. A Scientific Renaissance: Novel Drugs in Sickle Cell Disease. *Pediatr Clin North Am*. 2018 Jun;65(3):445–64.
229. Hoban MD, Orkin SH, Bauer DE. Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease. *Blood*. 2016 Feb 18;127(7):839–48.
230. Hoban MD, Lumaquin D, Kuo CY, Romero Z, Long J, Ho M, et al. CRISPR/Cas9-Mediated Correction of the Sickle Mutation in Human CD34+ cells. *Mol Ther*. 2016 Sep;24(9):1561–9.
231. Antoniani C, Meneghini V, Lattanzi A, Felix T, Romano O, Magrin E, et al. Induction of fetal hemoglobin synthesis by CRISPR/Cas9-mediated editing of the human β -globin locus. *Blood*. 2018 Apr 26;131(17):1960–73.
232. Demirci S, Leonard A, Essawi K, Tisdale JF. CRISPR-Cas9 to induce fetal hemoglobin for the treatment of sickle cell disease. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2021 Dec 10;23:276–85.
233. Qari MH, Aljaouni SK, Alardawi MS, Fatani H, Alsayes FM, Zografos P, et al. Reduction of painful vaso-occlusive crisis of sickle cell anaemia by tinzaparin in a double-blind randomized trial. *Thromb Haemost*. 2007 Aug;98(2):392–6.
234. Zhao D, Ding R, Mao Y, Wang L, Zhang Z, Ma X. Heparin rescues sepsis-associated acute lung injury and lethality through the suppression of inflammatory responses. *Inflammation*. 2012 Dec;35(6):1825–32.
235. Matsui NM, Varki A, Embury SH. Heparin inhibits the flow adhesion of sickle red blood cells to P-selectin. *Blood*. 2002 Nov 15;100(10):3790–6.
236. Salvaggio JE, Arnold CA, Banov CH. Long-term anticoagulation in sickle-cell disease. A clinical study. *N Engl J Med*. 1963 Jul 25;269:182–6.
237. Arumugam PI, Mullins ES, Shanmukhappa SK, Monia BP, Loberg A, Shaw MA, et al. Genetic diminution of circulating prothrombin ameliorates multiorgan pathologies in sickle cell disease mice. *Blood*. 2015 Oct 8;126(15):1844–55.
238. Ataga KI, Elsherif L, Wichlan D, Wogu AF, Matsui N, Pawlinski R, et al. A pilot study of the effect of rivaroxaban in sickle cell anemia. *Transfusion*. 2021 Jun;61(6):1694–8.
239. Cabannes R, Lonsdorfer J, Castaigne JP, Ondo A, Plassard A, Zohoun I. Clinical and biological double-blind-study of ticlopidine in preventive treatment of sickle-cell disease crises. *Agents Actions Suppl*. 1984;15:199–212.
240. Desai PC, Brittain JE, Jones SK, McDonald A, Wilson DR, Dominik R, et al. A pilot study of eptifibatide for treatment of acute pain episodes in sickle cell disease. *Thromb Res*. 2013 Sep;132(3):341–5.
241. Heeney MM, Hoppe CC, Abboud MR, Inusa B, Kanter J, Ogutu B, et al. A Multinational Trial of Prasugrel for Sickle Cell Vaso-Occlusive Events. *N Engl J Med*. 2016 Feb 18;374(7):625–35.
242. Weatherall DJ. The challenge of haemoglobinopathies in resource-poor countries. *Br J Haematol*. 2011 Sep;154(6):736–44.
243. NHS. Overview-Venous leg ulcer [Internet]. Available from: <https://www.nhs.uk/conditions/leg-ulcer/>

244. Alleyne SI, Wint E, Serjeant GR. Social effects of leg ulceration in sickle cell anemia. *South Med J.* 1977 Feb;70(2):213–4.
245. Powars DR, Chan LS, Hiti A, Ramicone E, Johnson C. Outcome of sickle cell anemia: a 4-decade observational study of 1056 patients. *Medicine (Baltimore).* 2005 Nov;84(6):363–76.
246. Cumming V, King L, Fraser R, Serjeant G, Reid M. Venous incompetence, poverty and lactate dehydrogenase in Jamaica are important predictors of leg ulceration in sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology.* 2008;142(1):119–25.
247. Olatunya OS, Albuquerque DM, Adekile AD, Costa FF. Evaluation of sociodemographic, clinical, and laboratory markers of sickle leg ulcers among young nigerians at a tertiary health institution. *Nigerian Journal of Clinical Practice.* 2018 Jan 7;21(7):882.
248. Antwi-Boasiako C, Andemariam B, Colombatti R, Asare EV, Strunk C, Piccone CM, et al. A study of the geographic distribution and associated risk factors of leg ulcers within an international cohort of sickle cell disease patients: the CASiRe group analysis. *Ann Hematol.* 2020 Sep;99(9):2073–9.
249. Spira JAO, Borges EL, Guedes ACM, Andrade PGR, Lima VL de AN. Prevalence of people with sickle cell disease and leg ulcers in Brazil: Socioeconomic and clinical overview. *PLoS One.* 2022 Sep 9;17(9):e0274254.
250. Madu A, Madu K, Anigbogu I, Ugwu AO, Okwulehie VA, Ololo U, et al. Phenotypic characterisation and associations of leg ulcers in adult sickle cell patients. *Wound Repair and Regeneration.* 2022;30(1):126–31.
251. Serjeant GR. Leg Ulceration in Sickle Cell Anemia. *Archives of Internal Medicine.* 1974 Apr 1;133(4):690–4.
252. Eckman JR. Leg Ulcers in Sickle Cell Disease. *Hematology/Oncology Clinics of North America.* 1996 Dec 1;10(6):1333–44.
253. Minniti CP, Delaney KMH, Gorbach AM, Xu D, Lee CCR, Malik N, et al. Vasculopathy, inflammation, and blood flow in leg ulcers of patients with sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 2014 Jan;89(1):1–6.
254. Durosinmi MA, Gevao SM, Esan GJ. Chronic leg ulcers in sickle cell disease: experience in Ibadan, Nigeria. *Afr J Med Med Sci.* 1991 Mar;20(1):11–4.
255. Delaney KMH, Axelrod KC, Buscetta A, Hassell KL, Adams-Graves PE, Seamon C, et al. Leg ulcers in Sickle Cell Disease: current pattern and practices. *Hemoglobin.* 2013;37(4).
256. Minniti CP, Taylor JG, Hildesheim M, O’Neal P, Wilson J, Castro O, et al. Laboratory and Echocardiography Markers in Sickle Cell Patients with Leg Ulcers. *Am J Hematol.* 2011 Aug;86(8):705–8.
257. Molnar JA, Underdown MJ, Clark WA. Nutrition and Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2014 Nov 1;3(11):663–81.
258. Stechmiller JK. Understanding the role of nutrition and wound healing. *Nutr Clin Pract.* 2010 Feb;25(1):61–8.

259. Serjeant GR, Serjeant BE, Mohan JS, Clare A. Leg ulceration in sickle cell disease: medieval medicine in a modern world. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2005 Oct;19(5):943–56, viii–ix.
260. Mohan JS, Marshall JM, Reid HL, Thomas PW, Serjeant GR. Postural vasoconstriction and leg ulceration in homozygous sickle cell disease. *Clin Sci (Lond).* 1997 Feb;92(2):153–8.
261. Gniadecka M, Gniadecki R, Serup J, Søndergaard J. Microvascular reactions to postural changes in patients with sickle cell anaemia. *Acta Derm Venereol.* 1994 May;74(3):191–3.
262. Oguanobi N, Onwubere B, Anisiuba B, Ike S, Ejim E, Ibegbulam O. Clinical findings associated with cardiovascular autonomic dysfunction in adult sickle cell anaemia patients. *Acta cardiologica.* 2012 Apr 1;67:169–75.
263. Hassan A, Gayus GL, Abdulrasheed I, Umar MA, Ismail DL, Babadoko AA. Chronic leg ulcers in sickle cell disease patients in Zaria, Nigeria. *Arch Int Surg.* 2014 Dec;4(3):141–5.
264. Gabuzda TG. Sickle Cell Leg Ulcers: Current Pathophysiologic Concepts. *International Journal of Dermatology.* 1975;14(5):322–5.
265. Ayoola OO, Bolarinwa RA, Onakpoya UU, Adedeji TA, Onwuka CC, Idowu BM. Intima-media thickness of the common femoral artery as a marker of leg ulceration in sickle cell disease patients. *Blood Adv.* 2018 Nov 19;2(22):3112–7.
266. Nolan VG, Adewoye A, Baldwin C, Wang L, Ma Q, Wyszynski DF, et al. Sickle Cell Leg Ulcers: Associations with Haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and Genes of the TGF- β /BMP Pathway. *Br J Haematol.* 2006 Jun;133(5):570–8.
267. Bartolucci P, Brugnara C, Teixeira-Pinto A, Pissard S, Moradkhani K, Jouault H, et al. Erythrocyte density in sickle cell syndromes is associated with specific clinical manifestations and hemolysis. *Blood.* 2012 Oct 11;120(15):3136–41.
268. Trent JT, Kirsner RS. Leg ulcers in sickle cell disease. *Advances in Skin & Wound Care.* 2004;17(8):410–146.
269. Francillon YJ, Jilly PN, Varricchio F, Castro O. Histochemical analysis of growth factor, fibronectin, and iron content of sickle cell leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 1996;4(2):240–3.
270. Bowers AS, Reid HL, Greenidge A, Landis C, Reid M. Blood Viscosity and the Expression of Inflammatory and Adhesion Markers in Homozygous Sickle Cell Disease Subjects with Chronic Leg Ulcers. *PLoS One.* 2013 Jul 26;8(7):e68929.
271. Domingos IF, Pereira-Martins DA, Sobreira MJVC, Oliveira RTD, Alagbe AE, Lanaro C, et al. High levels of proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8 are associated with a poor clinical outcome in sickle cell anemia. *Ann Hematol.* 2020 May 1;99(5):947–53.
272. Vicari P, Adegoke SA, Mazzotti DR, Cañado RD, Nogutti MAE, Figueiredo MS. Interleukin-1 β and interleukin-6 gene polymorphisms are associated with manifestations of sickle cell anemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* 2015 Mar 1;54(3):244–9.
273. Belisário AR, Mendes-Oliveira F, de Souza VR, Bolina-Santos E, Mendes FG, Moreno EC, et al. Association between inflammatory molecules, nitric oxide metabolites and leg ulcers in individuals with sickle cell anemia. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2022;44(2):169–76.

274. Ballas SK. Sick cell anemia with few painful crises is characterized by decreased red cell deformability and increased number of dense cells. *Am J Hematol*. 1991 Feb;36(2):122–30.
275. Bowers AS, Duncan WW, Pepple DJ. Red blood cell deformability is reduced in homozygous sickle cell disease patients with leg ulcers. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2016 Nov 25;64(2):199–204.
276. Hutz MH, Salzano FM, Adams J, Opitz JM. Hb F levels, longevity of homozygotes and clinical course of sickle cell anemia in Brazil. *American Journal of Medical Genetics*. 1983;14(4):669–76.
277. Adedeji MO, Ukoli FA. Haematological factors associated with leg ulcer in sickle cell disease. *Trop Geogr Med*. 1987 Oct;39(4):354–6.
278. Rodríguez Romero WE, Sáenz Renauld GF, Chaves Villalobos MA. Haplotipos de la hemoglobina S: importancia epidemiológica, antropológica y clínica. *Rev Panam Salud Publica*. 1998 Jan;3:1–8.
279. Powars D, Chan LS, Schroeder WA. The variable expression of sickle cell disease is genetically determined. *Semin Hematol*. 1990 Oct;27(4):360–76.
280. Higgs DR, Aldridge BE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Hayes RJ, et al. The Interaction of Alpha-Thalassemia and Homozygous Sickle-Cell Disease. *N Engl J Med*. 1982 Jun 17;306(24):1441–6.
281. Li B, Zhu X, Ward CM, Starlard-Davenport A, Takezaki M, Berry A, et al. MIR-144-mediated NRF2 gene silencing inhibits fetal hemoglobin expression in sickle cell disease. *Exp Hematol*. 2019 Feb;70:85-96.e5.
282. Jansen F, Yang X, Hoelscher M, Cattelan A, Schmitz T, Proebsting S, et al. Endothelial Microparticle–Mediated Transfer of MicroRNA-126 Promotes Vascular Endothelial Cell Repair via SPRED1 and Is Abrogated in Glucose-Damaged Endothelial Microparticles. *Circulation*. 2013 Oct 29;128(18):2026–38.
283. Santos E do C, Melo GIV, Santana PVB, Quadros IGS, Yahouédéhou SCMA, Guarda CC da, et al. A Description of the Hemolytic Component in Sickle Leg Ulcer: The Role of Circulating miR-199a-5p, miR-144, and miR-126. *Biomolecules*. 2022 Feb;12(2):317.
284. Silva DGH, Belini Junior E, Torres L de S, Ricci Júnior O, Lobo C de C, Bonini-Domingos CR, et al. Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2011 Jun 15;47(1):23–8.
285. de Oliveira Filho RA, Silva GJ, de Farias Domingos I, Domingues Hatzlhofer BL, da Silva Araujo A, de Lima Filho JL, et al. Association between the genetic polymorphisms of glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) and the clinical manifestations in sickle cell anemia | Elsevier Enhanced Reader. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2013;(51):76–9.
286. Salazar G, Colombo G, Lenna S, Antonioli R, Beretta L, Santaniello A, et al. HLA-B35 Influences the Apoptosis Rate in Human Peripheral Blood Mononucleated Cells and HLA-Transfected Cells. *Human Immunology*. 2007 Mar 1;68(3):181–91.
287. Santaniello A, Salazar G, Lenna S, Antonioli R, Colombo G, Beretta L, et al. HLA-B35 upregulates the production of endothelin-1 in HLA-transfected cells: a possible pathogenetic role in pulmonary hypertension. *Tissue Antigens*. 2006 Sep;68(3):239–44.

288. Lee JS, Wurfel MM, Matute-Bello G, Frevert CW, Rosengart MR, Ranganathan M, et al. The Duffy antigen modifies systemic and local tissue chemokine responses following lipopolysaccharide stimulation. *J Immunol*. 2006 Dec 1;177(11):8086–94.
289. Drasar ER, Menzel S, Fulford T, Thein SL. The effect of Duffy antigen receptor for chemokines on severity in sickle cell disease. *Haematologica*. 2013 Aug;98(8):e87–9.
290. Nebor D, Durpes MC, Mouguel D, Mukisi-Mukaza M, Elion J, Hardy-Dessources MD, et al. Association between Duffy antigen receptor for chemokines expression and levels of inflammation markers in sickle cell anemia patients. *Clinical Immunology*. 2010 Jul 1;136(1):116–22.
291. Afenyi-Annan A, Kail M, Combs MR, Orringer EP, Ashley-Koch A, Telen MJ. Lack of Duffy antigen expression is associated with organ damage in patients with sickle cell disease. *Transfusion*. 2008;48(5):917–24.
292. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science*. 2002 May 31;296(5573):1646–7.
293. Pastar I, Khan AA, Stojadinovic O, Lebrun EA, Medina MC, Brem H, et al. Induction of Specific MicroRNAs Inhibits Cutaneous Wound Healing. *J Biol Chem*. 2012 Aug 24;287(35):29324–35.
294. Batista THC, Santana RM, Sobreira MJ, Arcanjo GS, Domingos IF, Pereira-Martins DA, et al. Up-regulation of miR-130a is related to leg ulcers in sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*. 2022;197(1):e16–8.
295. de Carvalho-Siqueira GQ, Ananina G, de Souza BB, Borges MG, Ito MT, da Silva-Costa SM, et al. Highlight article: Whole-exome sequencing indicates FLG2 variant associated with leg ulcers in Brazilian sickle cell anemia patients. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2019 Aug;244(11):932–9.
296. Tan J, Smith A, Abisi S, Eastham D, Burnand KG. Tissue and Urinary Haemosiderin in Chronic Leg Ulcers. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2007 Sep 1;34(3):355–60.
297. Saad STO, Zago MA. Leg ulceration and abnormalities of calf blood flow in sickle-cell anemia. *European Journal of Haematology*. 1991;46(3):188–90.
298. Billet HH, Patel Y, Rivers SP. Venous insufficiency is not the cause of leg ulcers in sickle cell disease. *Am J Hematol*. 1991 Jun;37(2):133–4.
299. Clare A, FitzHenley M, Harris J, Hambleton I, Serjeant GR. Chronic leg ulceration in homozygous sickle cell disease: the role of venous incompetence. *British Journal of Haematology*. 2002;119(2):567–71.
300. Babalola OA, Ogunkeyede A, Odetunde AB, Fasola F, Oni AA, Babalola CP, et al. Haematological indices of sickle cell patients with chronic leg ulcers on compression therapy. *African Journal of Laboratory Medicine*. 2020 Dec 21;9(1):8.
301. MacFarlane DE, Baum KF, Serjeant GR. Bacteriology of sickle cell leg ulcers. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1986 Jan 1;80(4):553–6.
302. Ademiluyi SA, Rotimi VO, Coker AO, Banjo TO, Akinyanju O. The anaerobic and aerobic bacterial flora of leg ulcers in patients with sickle-cell disease. *Journal of Infection*. 1988 Sep 1;17(2):115–20.

303. Sehgal SC, Arunkumar BK. Microbial flora and its significance in pathology of sickle cell disease leg ulcers. *Infection*. 1992;20(2):86–8.
304. Byeon J, Blizinsky KD, Persaud A, Findley K, Lee JJ, Buscetta AJ, et al. Insights into the skin microbiome of sickle cell disease leg ulcers. *Wound Repair and Regeneration*. 2021;29(5):801–9.
305. Baum KF, MacFarlane DE, Cupidore L, Serjeant GR. *Corynebacterium diphtheriae* in sickle cell leg ulcers in Jamaica. *West Indian Med J*. 1985 Mar;34(1):24–8.
306. Mohammedsaeed W, Cruickshank S, McBain AJ, O’Neill CA. *Lactobacillus rhamnosus* GG Lysate Increases Re-Epithelialization of Keratinocyte Scratch Assays by Promoting Migration. *Sci Rep*. 2015 Nov 5;5:16147.
307. Senet P, Blas-Chatelain C, Levy P, Manea E m., Peschanski M, Mirault T, et al. Factors predictive of leg-ulcer healing in sickle cell disease: a multicentre, prospective cohort study. *British Journal of Dermatology*. 2017;177(1):206–11.
308. Nguyen VT, Nassar D, Batteux F, Raymond K, Tharaux PL, Aractingi S. Delayed Healing of Sickle Cell Ulcers Is due to Impaired Angiogenesis and CXCL12 Secretion in Skin Wounds. *Journal of Investigative Dermatology*. 2016 Feb 1;136(2):497–506.
309. Dissemond J, Hoeft D, Knab J, Franckson T, Kroger K, Goos M. Leg ulcer in a patient associated with hydroxyurea therapy. *International Journal of Dermatology*. 2006;45(2):158–60.
310. Hwang SW, Hong SK, Kim SH, Seo JK, Lee D, Sung HS. A Hydroxyurea-induced Leg Ulcer. *Ann Dermatol*. 2009 Feb;21(1):39–41.
311. Best PJ, Daoud MS, Pittelkow MR, Pettitt RM. Hydroxyurea-Induced Leg Ulceration in 14 Patients. *Ann Intern Med*. 1998 Jan;128(1):29–32.
312. Salmon-Ehr V, Leborgne G, Vilque JP, Potron G, Bernard P. Effets secondaires cutanés de l’hydroxyurée : étude prospective de 26 patients consultant dans un service de dermatologie. *La Revue de Médecine Interne*. 2000 Jan 1;21(1):30–4.
313. Soya E, Makowski C, Blaise S. Leg ulcer induced by hydroxycarbamide in sickle cell disease: What is the therapeutic impact? *Int Wound J*. 2019 Mar 27;16(4):897–902.
314. Tolu SS, Crouch A, Choi J, Gao Q, Reyes-Gil M, Ogu UO, et al. Hydroxyurea and fetal hemoglobin effect on leg ulcers in patients with sickle cell disease. *Ann Hematol*. 2022 Mar 1;101(3):541–8.
315. de Montalembert M, Voskaridou E, Oevermann L, Cannas G, Habibi A, Loko G, et al. Real-Life experience with hydroxyurea in patients with sickle cell disease: Results from the prospective ESCORT-HU cohort study. *Am J Hematol*. 2021 Oct 1;96(10):1223–31.
316. Kranke P, Bennett MH, Martyn-St James M, Schnabel A, Debus SE, Weibel S. Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Jun 24;2015(6):CD004123.
317. Gill AL, Bell CNA. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM: An International Journal of Medicine*. 2004 Jul 1;97(7):385–95.

318. Boykin JV, Baylis C. Hyperbaric oxygen therapy mediates increased nitric oxide production associated with wound healing: a preliminary study. *Adv Skin Wound Care*. 2007 Jul;20(7):382–8.
319. Alshurafa A, Alkhatib M, Abu-Tineh M, Yassin MA. Sickle cell leg ulcer successfully managed by hyperbaric oxygen: a case report. *Front Med (Lausanne)*. 2023;10:1171971.
320. Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME. Zinc and human health: an update. *Arch Toxicol*. 2012 Apr;86(4):521–34.
321. de Oliveira Fernandes Miranda CT, Vermeulen-Serpa KM, Cabanas Pedro AC, Brandão-Neto J, de Lima Vale SH, Figueiredo MS. Zinc in sickle cell disease: A narrative review. *J Trace Elem Med Biol*. 2022 Jul;72:126980.
322. Prasad AS, Beck FW, Kaplan J, Chandrasekar PH, Ortega J, Fitzgerald JT, et al. Effect of zinc supplementation on incidence of infections and hospital admissions in sickle cell disease (SCD). *Am J Hematol*. 1999 Jul;61(3):194–202.
323. Martyres DJ, Vijenthira A, Barrowman N, Harris-Janz S, Chretien C, Klaassen RJ. Nutrient Insufficiencies/Deficiencies in Children With Sickle Cell Disease and Its Association With Increased Disease Severity. *Pediatr Blood Cancer*. 2016 Jun;63(6):1060–4.
324. Serjeant GR, Galloway RE, Gueri MC. Oral zinc sulphate in sickle-cell ulcers. *Lancet*. 1970 Oct 31;2(7679):891–2.
325. Luo J dong, Chen AF. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol Sin*. 2005 Mar;26(3):259–64.
326. Jones ML, Ganopolsky JG, Labbé A, Wahl C, Prakash S. Antimicrobial properties of nitric oxide and its application in antimicrobial formulations and medical devices. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010 Sep;88(2):401–7.
327. Connor JL, Sclafani JA, Kato GJ, Hsieh MM, Minniti CP. Brief topical sodium nitrite and its impact on the quality of life in patients with sickle leg ulcers. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Nov;97(46):e12614.
328. Minniti CP, Knight-Madden J, Tonda M, Gray S, Lehrer-Graiwer J, Biemond BJ. The impact of voxelotor treatment on leg ulcers in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2021 Apr 1;96(4):E126–8.
329. Perrine SP, Ginder GD, Faller DV, Dover GH, Ikuta T, Witkowska HE, et al. A short-term trial of butyrate to stimulate fetal-globin-gene expression in the beta-globin disorders. *N Engl J Med*. 1993 Jan 14;328(2):81–6.
330. Atweh GF, Sutton M, Nassif I, Boosalis V, Dover GJ, Wallenstein S, et al. Sustained induction of fetal hemoglobin by pulse butyrate therapy in sickle cell disease. *Blood*. 1999 Mar 15;93(6):1790–7.
331. McMahan L, Tamary H, Askin M, Adams-Graves P, Eberhardt RT, Sutton M, et al. A randomized phase II trial of Arginine Butyrate with standard local therapy in refractory sickle cell leg ulcers. *Br J Haematol*. 2010 Dec;151(5):516–24.

332. Lionnet F, Bachmeyer C, Stankovic K, Tharaux PL, Girot R, Aractingi S. Efficacy of the endothelin receptor blocker bosentan for refractory sickle cell leg ulcers. *Br J Haematol*. 2008 Sep;142(6):991–2.
333. Aarts PA, Heethaar RM, Sixma JJ. Red blood cell deformability influences platelets--vessel wall interaction in flowing blood. *Blood*. 1984 Dec;64(6):1228–33.
334. Serjeant GR, Howard C. Isoxsuprine hydrochloride in the therapy of sickle cell leg ulceration. *West Indian Med J*. 1977 Sep;26(3):164–6.
335. Al-Jam'a AH, Al-Dabbous IA, Rafiq MS, Al-Khatti A, Al-Salem AH, Al-Baharna A, et al. Isoxsuprine in the treatment of sickle cell painful crises: A double-blind comparative study with narcotic analgesic. *Ann Saudi Med*. 1999;19(2):97–100.
336. Afifi AM, Adnan M, Taha M, Amasha ME. Xanthinol nicotinate in the management of leg ulcers associated with haemoglobinopathies. *Curr Med Res Opin*. 1979;6(5):309–13.
337. al-Momen AK. Recombinant human erythropoietin induced rapid healing of a chronic leg ulcer in a patient with sickle cell disease. *Acta Haematol*. 1991;86(1):46–8.
338. Frost ML, Treadwell P. Treatment of sickle cell leg ulcers with pentoxifylline. *Int J Dermatol*. 1990 Jun;29(5):375–6.
339. Porter JM, Cutler BS, Lee BY, Reich T, Reichle FA, Scogin JT, et al. Pentoxifylline efficacy in the treatment of intermittent claudication: multicenter controlled double-blind trial with objective assessment of chronic occlusive arterial disease patients. *Am Heart J*. 1982 Jul;104(1):66–72.
340. Goksel E, Ugurel E, Nader E, Boisson C, Muniansi I, Joly P, et al. A preliminary study of phosphodiesterases and adenylyl cyclase signaling pathway on red blood cell deformability of sickle cell patients. *Front Physiol*. 2023;14:1215835.
341. Alhasaniah AH. L-carnitine: Nutrition, pathology, and health benefits. *Saudi J Biol Sci*. 2023 Feb;30(2):103555.
342. Serjeant BE, Harris J, Thomas P, Serjeant GR. Propionyl-L-carnitine in chronic leg ulcers of homozygous sickle cell disease: a pilot study. *J Am Acad Dermatol*. 1997 Sep;37(3 Pt 1):491–3.
343. Duscher D, Januszyk M, Maan ZN, Whittam AJ, Hu MS, Walmsley GG, et al. Comparison of the Hydroxylase Inhibitor Dimethyloxalylglycine and the Iron Chelator Deferoxamine in Diabetic and Aged Wound Healing. *Plast Reconstr Surg*. 2017 Mar;139(3):695e–706e.
344. Rodrigues M, Bonham CA, Minniti CP, Gupta K, Longaker MT, Gurtner GC. Iron Chelation with Transdermal Deferoxamine Accelerates Healing of Murine Sickle Cell Ulcers. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2018 Oct 1;7(10):323–32.
345. Cacciola E, Musso R, Giustolisi R, Cacciola E, Alessi M. Blood hypercoagulability as a risk factor for leg ulcers in sickle cell disease. *Blood*. 1990 Jun 15;75(12):2467–8.
346. Adelson Harvey T. Long-Term Dicumarol Administration as a Therapeutic Trial in Sicklemia. *New England Journal of Medicine*. 1957 Feb 21;256(8):353–4.
347. Minniti CP, Kato GJ. Critical Reviews: How we treat sickle cell patients with leg ulcers. *American Journal of Hematology*. 2016;91(1):22–30.

348. Franks PJ, Barker J, Collier M, Gethin G, Haesler E, Jawien A, et al. Management of Patients With Venous Leg Ulcers: Challenges and Current Best Practice. *J Wound Care*. 2016 Jun;25 Suppl 6:S1–67.
349. Cooper ML, Hansbrough JF, Foreman TJ. In vitro effects of matrix peptides on a cultured dermal-epidermal skin substitute. *J Surg Res*. 1990 Jun;48(6):528–33.
350. Wethers DL, Ramirez GM, Koshy M, Steinberg MH, Phillips G, Siegel RS, et al. Accelerated healing of chronic sickle-cell leg ulcers treated with RGD peptide matrix. RGD Study Group. *Blood*. 1994 Sep 15;84(6):1775–9.
351. Mertz PM, Davis SC, Franzen L, Uchima FD, Pickett MP, Pierschbacher MD, et al. Effects of an arginine-glycine-aspartic acid peptide-containing artificial matrix on epithelial migration in vitro and experimental second-degree burn wound healing in vivo. *J Burn Care Rehabil*. 1996;17(3):199–206.
352. Steed DL, Ricotta JJ, Prendergast JJ, Kaplan RJ, Webster MW, McGill JB, et al. Promotion and acceleration of diabetic ulcer healing by arginine-glycine-aspartic acid (RGD) peptide matrix. RGD Study Group. *Diabetes Care*. 1995 Jan;18(1):39–46.
353. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg*. 2013 Mar;32(1):41–52.
354. Machado RS, Viana S, Sbruzzi G. Low-level laser therapy in the treatment of pressure ulcers: systematic review. *Lasers Med Sci*. 2017 May;32(4):937–44.
355. Flemming K, Cullum N. Laser therapy for venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD001182.
356. Li S, Wang C, Wang B, Liu L, Tang L, Liu D, et al. Efficacy of low-level light therapy for treatment of diabetic foot ulcer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018 Sep;143:215–24.
357. Khaleel Ahmed M, Jafer M, Nayeem M, Hussain Moafa I, Quadri MFA, Gopalaiah H, et al. Low-Level Laser Therapy and Topical Medications for Treating Aphthous Ulcers: A Systematic Review. *J Multidiscip Healthc*. 2020;13:1595–605.
358. Bonini-Domingos CR, Valente FM. Low-level laser therapy of leg ulcer in sickle cell anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(1):65–6.
359. Massenburg BB, Himel HN. Healing of chronic sickle cell disease-associated foot and ankle wounds using transdermal continuous oxygen therapy. *J Wound Care*. 2016 Feb;25(2):S23-24, S26-27.
360. Igwegbe I, Onojobi G, Fadojutimi-Akinsiku MO, Hirsh AM, Park NJ, Yao M, et al. Case studies evaluating transdermal continuous oxygen for the treatment of chronic sickle cell ulcers. *Adv Skin Wound Care*. 2015 May;28(5):206–10.
361. Varetto G, Verzini F, Trucco A, Frola E, Spalla F, Gibello L, et al. Oxygen Delivery Therapy with EPIFLO Reduces Wound Hyperperfusion in Patients with Chronic Leg Ulcers: A Laser Speckle Contrast Analysis. *Ann Vasc Surg*. 2020 Apr;64:246–52.

362. Driver VR, Reyzelman A, Kawalec J, French M. A Prospective, Randomized, Blinded, Controlled Trial Comparing Transdermal Continuous Oxygen Delivery to Moist Wound Therapy for the Treatment of Diabetic Foot Ulcers. *Ostomy Wound Manage.* 2017 Apr;63(4):12–28.
363. Meneses JVL, Fortuna V, de Souza ES, Daltro GC, Meyer R, Minniti CP, et al. Autologous stem cell-based therapy for sickle cell leg ulcer: a pilot study. *Br J Haematol.* 2016 Dec;175(5):949–55.
364. Daltro GC, Fortuna V, de Souza ES, Salles MM, Carreira AC, Meyer R, et al. Efficacy of autologous stem cell-based therapy for osteonecrosis of the femoral head in sickle cell disease: a five-year follow-up study. *Stem Cell Res Ther.* 2015 May 29;6(1):110.
365. El Hage R, Knippschild U, Arnold T, Hinterseher I. Stem Cell-Based Therapy: A Promising Treatment for Diabetic Foot Ulcer. *Biomedicines.* 2022 Jun 25;10(7):1507.
366. Wahid FSA, Ismail NA, Wan Jamaludin WF, Muhamad NA, Mohamad Idris MA, Lai NM. Efficacy and Safety of Autologous Cell-based Therapy in Patients with No-option Critical Limb Ischaemia: A Meta-Analysis. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2018;13(4):265–83.
367. Okany CC, Atimomo CE, Akinyanju OO. Efficacy of natural honey in the healing of leg ulcers in sickle cell anaemia. *Niger Postgrad Med J.* 2004 Sep;11(3):179–81.
368. Caboche-Salouhi P, Le Seac’h A, Lionnet F, Santin A, Mattioni S, Tamboura F, et al. “SCULP” study: The benefits of skin graft pellets on the pain of sickle cell leg ulcers (SCLU). *J Med Vasc.* 2023 Sep;48(3–4):100–4.
369. Horch RE, Dragu A, Lang W, Banwell P, Leffler M, Grimm A, et al. Coverage of exposed bones and joints in critically ill patients: lower extremity salvage with topical negative pressure therapy. *J Cutan Med Surg.* 2008;12(5):223–9.
370. Oliveira Paggiaro A, Fernandes de Carvalho V, Hencklain Fonseca GH, Doi A, Castro Ferreira M. Negative pressure therapy for complex wounds in patients with sickle-cell disease: a case study. *Ostomy Wound Manage.* 2010 Aug;56(8):62–7.
371. Nejati R, Kovacic D, Slominski A. Neuro-immune-endocrine functions of the skin: an overview. *Expert Rev Dermatol.* 2013;8(6):581–3.
372. Agrawal R, Hu A, Bollag WB. The Skin and Inflamm-Aging. *Biology (Basel).* 2023 Nov 2;12(11):1396.
373. Kupper TS, Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol.* 2004 Mar;4(3):211–22.
374. Munger BL, Ide C. The structure and function of cutaneous sensory receptors. *Arch Histol Cytol.* 1988 Mar;51(1):1–34.
375. Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev.* 2006 Oct;86(4):1309–79.
376. Laverdet B, Danigo A, Girard D, Magy L, Demiot C, Desmoulière A. Skin innervation: important roles during normal and pathological cutaneous repair. *Histol Histopathol.* 2015 Aug;30(8):875–92.

377. Talagas M. Anatomical contacts between sensory neurons and epidermal cells: an unrecognized anatomical network for neuro-immuno-cutaneous crosstalk. *Br J Dermatol*. 2023 Feb 10;188(2):176–85.
378. Hilliges M, Wang L, Johansson O. Ultrastructural evidence for nerve fibers within all vital layers of the human epidermis. *J Invest Dermatol*. 1995 Jan;104(1):134–7.
379. Braverman IM. The cutaneous microcirculation. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2000 Dec;5(1):3–9.
380. Chao CYL, Cheing GLY. Microvascular dysfunction in diabetic foot disease and ulceration. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009 Oct;25(7):604–14.
381. Cracowski JL, Roustit M. Human Skin Microcirculation. *Compr Physiol*. 2020 Jul 8;10(3):1105–54.
382. Martínez-Martínez E, Souza-Neto FV, Jiménez-González S, Cachofeiro V. Oxidative Stress and Vascular Damage in the Context of Obesity: The Hidden Guest. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Mar 8;10(3):406.
383. Paquet-Fifield S, Schlüter H, Li A, Aitken T, Gangatirkar P, Blashki D, et al. A role for pericytes as microenvironmental regulators of human skin tissue regeneration. *J Clin Invest*. 2009 Sep;119(9):2795–806.
384. Skobe M, Detmar M. Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2000 Dec;5(1):14–9.
385. Suami H, Koelmeyer L, Mackie H, Boyages J. Patterns of lymphatic drainage after axillary node dissection impact arm lymphoedema severity: A review of animal and clinical imaging studies. *Surg Oncol*. 2018 Dec;27(4):743–50.
386. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch*. 2000 Sep;440(5):653–66.
387. Anderson JM, Van Itallie CM. Physiology and Function of the Tight Junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Aug;1(2):a002584.
388. Goodenough DA, Paul DL. Gap Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Jul;1(1):a002576.
389. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*. 2003 Sep;196(3):430–43.
390. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3527–61.
391. Sadler JE. Thrombomodulin structure and function. *Thromb Haemost*. 1997 Jul;78(1):392–5.
392. Kato H. Regulation of functions of vascular wall cells by tissue factor pathway inhibitor: basic and clinical aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Apr 1;22(4):539–48.
393. Emeis J. The Control of tPA and PAI-1 Secretion from the Vessel Wall. *Vascular Medicine Review*. 1995 May 1;vmr-6(2):153–66.

394. Gross PL, Aird WC. The endothelium and thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2000;26(5):463–78.
395. Malek AM, Izumo S. Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J Cell Sci.* 1996 Apr;109 (Pt 4):713–26.
396. Xiao Z, Zhang Z, Ranjan V, Diamond SL. Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium-activated. *J Cell Physiol.* 1997 May;171(2):205–11.
397. Ching LC, Kou YR, Shyue SK, Su KH, Wei J, Cheng LC, et al. Molecular mechanisms of activation of endothelial nitric oxide synthase mediated by transient receptor potential vanilloid type 1. *Cardiovasc Res.* 2011 Aug 1;91(3):492–501.
398. Chien S, Li S, Shyy YJ. Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *Hypertension.* 1998 Jan;31(1 Pt 2):162–9.
399. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature.* 2002 Dec 19;420(6917):846–52.
400. Eelen G, de Zeeuw P, Simons M, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. *Circ Res.* 2015 Mar 27;116(7):1231–44.
401. Okazaki K, Fu Q, Martini ER, Shook R, Conner C, Zhang R, et al. Vasoconstriction during venous congestion: effects of venoarteriolar response, myogenic reflexes, and hemodynamics of changing perfusion pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Nov;289(5):R1354–1359.
402. Robertson D, Biaggioni I, Burnstock G, Low PA. 38 - Venoarteriolar reflex. In: *Primer on the Autonomic Nervous System.* 2nd ed. Cambridge, Massachusetts: Academic Press,; p. 152–3.
403. Crandall CG, Shibasaki M, Yen TC. Evidence that the human cutaneous venoarteriolar response is not mediated by adrenergic mechanisms. *J Physiol.* 2002 Jan 15;538(Pt 2):599–605.
404. Belcaro G, Grigg M, Rulo A, Nicolaidis A. Blood flow in the perimalleolar skin in relation to posture in patients with venous hypertension. *Ann Vasc Surg.* 1989 Jan;3(1):5–7.
405. Ross JP. Some unsolved problems in the surgery of the sympathetic nervous system. *Q Bull Northwest Univ Med Sch.* 1954;28(1):1–9.
406. Johnson J, Minson C, Kellogg D. Cutaneous vasodilator and vasoconstrictor mechanisms in temperature regulation. In: *Comprehensive Physiology.* Terjung R. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.; p. 33–89.
407. Moran MM, McAlexander MA, Bíró T, Szallasi A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Aug 1;10(8):601–20.
408. Chiu IM, von Hehn CA, Woolf CJ. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nat Neurosci.* 2012 Jul 26;15(8):1063–7.
409. Szolcsányi J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides.* 2004 Dec;38(6):377–84.

410. Chu DQ, Cox HM, Costa SKP, Herzog H, Brain SD. The ability of neuropeptide Y to mediate responses in the murine cutaneous microvasculature: an analysis of the contribution of Y1 and Y2 receptors. *Br J Pharmacol*. 2003 Sep;140(2):422–30.
411. Dumont Y, Bastianetto S, Durantou A, Breton L, Quirion R. Immunohistochemical distribution of neuropeptide Y, peptide YY, pancreatic polypeptide-like immunoreactivity and their receptors in the epidermal skin of healthy women. *Peptides*. 2015 Aug;70:7–16.
412. Liu X, Miller MJ, Joshi MS, Sadowska-Krowicka H, Clark DA, Lancaster JR. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem*. 1998 Jul 24;273(30):18709–13.
413. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev*. 1997 Jun;49(2):137–42.
414. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994 Sep 23;78(6):915–8.
415. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:707–36.
416. Farah C, Michel LYM, Balligand JL. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol*. 2018 May;15(5):292–316.
417. Chen WH, Chen CH, Hsu MC, Chang RW, Wang CH, Lee TS. Advances in the molecular mechanisms of statins in regulating endothelial nitric oxide bioavailability: Interlocking biology between eNOS activity and L-arginine metabolism. *Biomed Pharmacother*. 2024 Feb;171:116192.
418. Sugimoto M, Nakayama M, Goto TM, Amano M, Komori K, Kaibuchi K. Rho-kinase phosphorylates eNOS at threonine 495 in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Sep 21;361(2):462–7.
419. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci*. 2015 Oct;129(2):83–94.
420. Katusic ZS, d’Uscio L, Nath KA. Vascular Protection by Tetrahydrobiopterin: Progress and Therapeutic Prospects. *Trends Pharmacol Sci*. 2009 Jan;30(1):48–54.
421. Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*. 1999 May 5;1411(2–3):334–50.
422. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta*. 1999 May 5;1411(2–3):273–89.
423. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Feb;7(2):156–67.
424. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov 27;288(5789):373–6.
425. Jin RC, Loscalzo J. Vascular Nitric Oxide: Formation and Function. *J Blood Med*. 2010 Aug 1;2010(1):147–62.

426. Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol*. 1996;9(5):836–44.
427. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):315–424.
428. Wink DA, Miranda KM, Espey MG. Cytotoxicity related to oxidative and nitrosative stress by nitric oxide. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001 Jul;226(7):621–3.
429. Selemidis S, Dusting GJ, Peshavariya H, Kemp-Harper BK, Drummond GR. Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2007 Jul 15;75(2):349–58.
430. Gkaliagkousi E, Ritter J, Ferro A. Platelet-derived nitric oxide signaling and regulation. *Circ Res*. 2007 Sep 28;101(7):654–62.
431. FitzGerald GA. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol*. 1991 Sep 3;68(7):11B-15B.
432. Maurice DH, Haslam RJ. Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP. *Mol Pharmacol*. 1990 May;37(5):671–81.
433. Pigazzi A, Heydrick S, Folli F, Benoit S, Michelson A, Loscalzo J. Nitric oxide inhibits thrombin receptor-activating peptide-induced phosphoinositide 3-kinase activity in human platelets. *J Biol Chem*. 1999 May 14;274(20):14368–75.
434. Gladwin MT, Kato GJ. Cardiopulmonary complications of sickle cell disease: role of nitric oxide and hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005;51–7.
435. Cortese-Krott MM, Kelm M. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function? *Redox Biol*. 2014;2:251–8.
436. Huang KT, Keszler A, Patel N, Patel RP, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB, et al. The reaction between nitrite and deoxyhemoglobin. Reassessment of reaction kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem*. 2005 Sep 2;280(35):31126–31.
437. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med*. 2003 Dec;9(12):1498–505.
438. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Jax T, Kerber S, Gharini P, et al. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic Biol Med*. 2006 Jan 15;40(2):295–302.
439. Ulker P, Yaras N, Yalcin O, Celik-Ozenci C, Johnson PC, Meiselman HJ, et al. Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells. *Nitric Oxide*. 2011 May 31;24(4):184–91.
440. Ulker P, Gunduz F, Meiselman HJ, Baskurt OK. Nitric oxide generated by red blood cells following exposure to shear stress dilates isolated small mesenteric arteries under hypoxic conditions. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2013;54(4):357–69.

441. Starzyk D, Korbut R, Gryglewski RJ. The role of nitric oxide in regulation of deformability of red blood cells in acute phase of endotoxaemia in rats. *J Physiol Pharmacol*. 1997 Dec;48(4):731–5.
442. Grau M, Pauly S, Ali J, Walpurgis K, Thevis M, Bloch W, et al. RBC-NOS-dependent S-nitrosylation of cytoskeletal proteins improves RBC deformability. *PLoS One*. 2013;8(2):e56759.
443. Bor-Kucukatay M, Wenby RB, Meiselman HJ, Baskurt OK. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 May;284(5):H1577-1584.
444. Gladwin MT, Shelhamer JH, Schechter AN, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Panza JA, et al. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Oct 10;97(21):11482–7.
445. Pluchart H, Khouri C, Blaise S, Roustit M, Cracowski JL. Targeting the Prostacyclin Pathway: Beyond Pulmonary Arterial Hypertension. *Trends Pharmacol Sci*. 2017 Jun;38(6):512–23.
446. Hirata T, Narumiya S. Prostanoid receptors. *Chem Rev*. 2011 Oct 12;111(10):6209–30.
447. Jiménez R, Sánchez M, Zarzuelo MJ, Romero M, Quintela AM, López-Sepúlveda R, et al. Endothelium-dependent vasodilator effects of peroxisome proliferator-activated receptor beta agonists via the phosphatidylinositol-3 kinase-Akt pathway. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Feb;332(2):554–61.
448. Peshavariya HM, Liu GS, Chang CWT, Jiang F, Chan EC, Dusting GJ. Prostacyclin signaling boosts NADPH oxidase 4 in the endothelium promoting cytoprotection and angiogenesis. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jun 10;20(17):2710–25.
449. Edwards G, Féléto M, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *Pflugers Arch*. 2010 May;459(6):863–79.
450. Garland CJ, Dora KA. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017 Jan;219(1):152–61.
451. Burnstock G, Ralevic V. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacol Rev*. 2014;66(1):102–92.
452. Pence BD, Woods JA. Exercise, Obesity, and Cutaneous Wound Healing: Evidence from Rodent and Human Studies. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014 Jan 1;3(1):71–9.
453. Lasne D, Jude B, Susen S. From normal to pathological hemostasis. *Can J Anaesth*. 2006 Jun;53(6 Suppl):S2-11.
454. Heemskerk JWM, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*. 2002 Aug;88(2):186–93.
455. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth*. 2014;58(5):515–23.
456. Chen J, López JA. Interactions of platelets with subendothelium and endothelium. *Microcirculation*. 2005;12(3):235–46.
457. Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res Int*. 2016;2016:9060143.

458. Sorrentino S, Studt JD, Medalia O, Tanuj Sapra K. Roll, adhere, spread and contract: structural mechanics of platelet function. *Eur J Cell Biol.* 2015;94(3–4):129–38.
459. Tracy LE, Minasian RA, Catterson EJ. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2016 Mar 1;5(3):119–36.
460. Olczyk P, Mencner Ł, Komosinska-Vassev K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *Biomed Res Int.* 2014;2014:747584.
461. McFadyen JD, Kaplan ZS. Platelets are not just for clots. *Transfus Med Rev.* 2015 Apr;29(2):110–9.
462. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011 Jul 25;11(8):519–31.
463. Schnoor M, Alcaide P, Voisin MB, van Buul JD. Crossing the Vascular Wall: Common and Unique Mechanisms Exploited by Different Leukocyte Subsets during Extravasation. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:946509.
464. Su Y, Richmond A. Chemokine Regulation of Neutrophil Infiltration of Skin Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015 Nov 1;4(11):631–40.
465. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
466. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2010 Jun;10(6):427–39.
467. Ridiandries A, Tan JTM, Bursill CA. The Role of Chemokines in Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2018 Oct 18;19(10):3217.
468. Willenborg S, Eming SA. Macrophages - sensors and effectors coordinating skin damage and repair. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2014 Mar;12(3):214–21, 214–23.
469. Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev.* 2015 Mar;264(1):182–203.
470. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature.* 2014 Jun 5;510(7503):92–101.
471. Dalli J, Serhan C. Macrophage Proresolving Mediators-the When and Where. *Microbiol Spectr.* 2016 Jun;4(3).
472. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity.* 2014 Mar 20;40(3):315–27.
473. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol.* 2013 Jan;229(2):176–85.
474. Landén NX, Li D, Ståhle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci.* 2016 Oct;73(20):3861–85.

475. Kaltalioglu K, Coskun-Cevher S. A bioactive molecule in a complex wound healing process: platelet-derived growth factor. *Int J Dermatol*. 2015 Aug;54(8):972–7.
476. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol*. 2007 May;127(5):998–1008.
477. Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*. 2010 Aug;30(3):245–57.
478. Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014 Jul 1;3(7):445–64.
479. Santoro MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res*. 2005 Mar 10;304(1):274–86.
480. Murdoch C, Muthana M, Lewis CE. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J Immunol*. 2005 Nov 15;175(10):6257–63.
481. Yetkin-Arik B, Kastelein AW, Klaassen I, Jansen CHJR, Latul YP, Vittori M, et al. Angiogenesis in gynecological cancers and the options for anti-angiogenesis therapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021 Jan;1875(1):188446.
482. Neve A, Cantatore FP, Maruotti N, Corrado A, Ribatti D. Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions. *Biomed Res Int*. 2014;2014:756078.
483. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol*. 2002 Feb;118(2):211–5.
484. Cattin AL, Burden JJ, Van Emmenis L, Mackenzie FE, Hoving JJA, Garcia Calavia N, et al. Macrophage-Induced Blood Vessels Guide Schwann Cell-Mediated Regeneration of Peripheral Nerves. *Cell*. 2015 Aug 27;162(5):1127–39.
485. Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron*. 2002 Aug 15;35(4):657–69.
486. Maquart FX, Monboisse JC. Extracellular matrix and wound healing. *Pathol Biol (Paris)*. 2014 Apr;62(2):91–5.
487. Uberti F, Morsanuto V, Ghirlanda S, Ruga S, Clemente N, Boieri C, et al. Highly Diluted Acetylcholine Promotes Wound Repair in an In Vivo Model. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2018 Apr 1;7(4):121–33.
488. Ashrafi M, Alonso-Rasgado T, Baguneid M, Bayat A. The efficacy of electrical stimulation in experimentally induced cutaneous wounds in animals. *Vet Dermatol*. 2016 Aug;27(4):235-e57.
489. Pullar CE, Isseroff RR. The beta 2-adrenergic receptor activates pro-migratory and pro-proliferative pathways in dermal fibroblasts via divergent mechanisms. *J Cell Sci*. 2006 Feb 1;119(Pt 3):592–602.

490. Schmelz M, Petersen LJ. Neurogenic inflammation in human and rodent skin. *News Physiol Sci*. 2001 Feb;16:33–7.
491. Granstein RD, Wagner JA, Stohl LL, Ding W. Calcitonin gene-related peptide: key regulator of cutaneous immunity. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015 Mar;213(3):586–94.
492. Aubdool AA, Brain SD. Neurovascular aspects of skin neurogenic inflammation. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2011 Dec;15(1):33–9.
493. Rosa AC, Fantozzi R. The role of histamine in neurogenic inflammation. *Br J Pharmacol*. 2013 Sep;170(1):38–45.
494. Beidler SK, Douillet CD, Berndt DF, Keagy BA, Rich PB, Marston WA. Inflammatory cytokine levels in chronic venous insufficiency ulcer tissue before and after compression therapy. *J Vasc Surg*. 2009 Apr;49(4):1013–20.
495. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5):585–601.
496. Zheng SY, Wan XX, Kambey PA, Luo Y, Hu XM, Liu YF, et al. Therapeutic role of growth factors in treating diabetic wound. *World J Diabetes*. 2023 Apr 15;14(4):364–95.
497. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1994 Oct 28;269(43):26988–95.
498. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014 Oct 1;3(10):647–61.
499. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 2000 Aug 1;50(3):184–95.
500. Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci*. 2001 Jan;114(Pt 1):131–9.
501. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008 Jan 1;13:453–61.
502. Hübner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fässler R, Werner S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine*. 1996 Jul;8(7):548–56.
503. Ruysen-Witrand A, Gossec L, Salliot C, Luc M, Duclos M, Guignard S, et al. Complication rates of 127 surgical procedures performed in rheumatic patients receiving tumor necrosis factor alpha blockers. *Clin Exp Rheumatol*. 2007;25(3):430–6.
504. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996 Mar 15;87(6):2095–147.
505. Cohen I, Rider P, Carmi Y, Braiman A, Dotan S, White MR, et al. Differential release of chromatin-bound IL-1alpha discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 9;107(6):2574–9.

506. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011 Apr 7;117(14):3720–32.
507. Patel S, Maheshwari A, Chandra A. Biomarkers for wound healing and their evaluation. *J Wound Care*. 2016 Jan;25(1):46–55.
508. Mirza RE, Fang MM, Ennis WJ, Koh TJ. Blocking interleukin-1 β induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2013 Jul;62(7):2579–87.
509. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest*. 1998 Jan 15;101(2):311–20.
510. Gabay C, Smith MF, Eidlen D, Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. *J Clin Invest*. 1997 Jun 15;99(12):2930–40.
511. Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM. The Role of IL-6 in Skin Fibrosis and Cutaneous Wound Healing. *Biomedicines*. 2020 Apr 30;8(5):101.
512. Biffi WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg*. 1996 Nov;224(5):647–64.
513. Rennekampff HO, Hansbrough JF, Kiessig V, Doré C, Sticherling M, Schröder JM. Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. *J Surg Res*. 2000 Sep;93(1):41–54.
514. Adams DH, Lloyd AR. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet*. 1997 Feb 15;349(9050):490–5.
515. JIANG WG, SANDERS AJ, RUGE F, HARDING KG. Influence of interleukin-8 (IL-8) and IL-8 receptors on the migration of human keratinocytes, the role of PLC- γ and potential clinical implications. *Exp Ther Med*. 2012 Feb;3(2):231–6.
516. Devalaraja RM, Nanney LB, Du J, Qian Q, Yu Y, Devalaraja MN, et al. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol*. 2000 Aug;115(2):234–44.
517. Saraiva M, Vieira P, O’Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med*. 2020 Jan 6;217(1):e20190418.
518. Gordon A, Kozin ED, Keswani SG, Vaikunth SS, Katz AB, Zoltick PW, et al. Permissive environment in postnatal wounds induced by adenoviral-mediated overexpression of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 prevents scar formation. *Wound Repair Regen*. 2008;16(1):70–9.
519. Short WD, Steen E, Kaul A, Wang X, Olutoye OO, Vangapandu HV, et al. IL-10 promotes endothelial progenitor cell infiltration and wound healing via STAT3. *FASEB J*. 2022 Jul;36(7):e22298.
520. Short WD, Rae M, Lu T, Padon B, Prajapati TJ, Faruk F, et al. Endogenous Interleukin-10 Contributes to Wound Healing and Regulates Tissue Repair. *J Surg Res*. 2023 May;285:26–34.

521. Berger C, Berger M, Hackman RC, Gough M, Elliott C, Jensen MC, et al. Safety and immunologic effects of IL-15 administration in nonhuman primates. *Blood*. 2009 Sep 17;114(12):2417–26.
522. Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K. Interleukin 15 induces the signals of epidermal proliferation through ERK and PI 3-kinase in a human epidermal keratinocyte cell line, HaCaT. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Feb 21;301(4):841–7.
523. Lindner G, Rückert R, Bulfone-Paus S, Paus R. Inhibition of chemotherapy-induced keratinocyte apoptosis in vivo by an interleukin-15-IgG fusion protein. *J Invest Dermatol*. 1998 Apr;110(4):457–8.
524. Kagimoto Y, Yamada H, Ishikawa T, Maeda N, Goshima F, Nishiyama Y, et al. A regulatory role of interleukin 15 in wound healing and mucosal infection in mice. *J Leukoc Biol*. 2008 Jan;83(1):165–72.
525. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1962 Jun 15;48(6):1014–22.
526. Kandhwal M, Behl T, Singh S, Sharma N, Arora S, Bhatia S, et al. Role of matrix metalloproteinase in wound healing. *Am J Transl Res*. 2022;14(7):4391–405.
527. Fu K, Zheng X, Chen Y, Wu L, Yang Z, Chen X, et al. Role of matrix metalloproteinases in diabetic foot ulcers: Potential therapeutic targets. *Front Pharmacol* [Internet]. 2022 Oct 20 [cited 2024 Aug 2];13. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2022.1050630/full>
528. Izzo V, Meloni M, Vainieri E, Giurato L, Ruotolo V, Uccioli L. High matrix metalloproteinase levels are associated with dermal graft failure in diabetic foot ulcers. *Int J Low Extrem Wounds*. 2014 Sep;13(3):191–6.
529. Danielsen PL, Holst AV, Maltesen HR, Bassi MR, Holst PJ, Heinemeier KM, et al. Matrix metalloproteinase-8 overexpression prevents proper tissue repair. *Surgery*. 2011 Nov;150(5):897–906.
530. Muller M, Trocme C, Lardy B, Morel F, Halimi S, Benhamou PY. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet Med*. 2008 Apr;25(4):419–26.
531. Gooyit M, Peng Z, Wolter WR, Pi H, Ding D, Heseck D, et al. A chemical biological strategy to facilitate diabetic wound healing. *ACS Chem Biol*. 2014 Jan 17;9(1):105–10.
532. Zheng L, Amano K, Iohara K, Ito M, Imabayashi K, Into T, et al. Matrix metalloproteinase-3 accelerates wound healing following dental pulp injury. *Am J Pathol*. 2009 Nov;175(5):1905–14.
533. Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, Waldmann K, Schiweck S, Lehnert H. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia*. 2002 Jul;45(7):1011–6.
534. Christoffersson G, Vågesjö E, Vandooren J, Lidén M, Massena S, Reinert RB, et al. VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood*. 2012 Nov 29;120(23):4653–62.

535. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3291–310.
536. Scholl FA, Dumesic PA, Barragan DI, Harada K, Bissonauth V, Charron J, et al. Mek1/2 MAPK kinases are essential for Mammalian development, homeostasis, and Raf-induced hyperplasia. *Dev Cell*. 2007 Apr;12(4):615–29.
537. Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol*. 2015 Aug;173(2):370–8.
538. Chi YW, Raffetto JD. Venous leg ulceration pathophysiology and evidence based treatment. *Vasc Med*. 2015 Apr;20(2):168–81.
539. Raffetto JD. Pathophysiology of Chronic Venous Disease and Venous Ulcers. *Surg Clin North Am*. 2018 Apr;98(2):337–47.
540. Mannello F, Raffetto JD. Matrix metalloproteinase activity and glycosaminoglycans in chronic venous disease: the linkage among cell biology, pathology and translational research. *Am J Transl Res*. 2011 Feb;3(2):149–58.
541. Burian EA, Sabah L, Karlsmark T, Kirketerp-Møller K, Moffatt CJ, Thyssen JP, et al. Cytokines and Venous Leg Ulcer Healing-A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun 10;23(12):6526.
542. Barwell JR, Davies CE, Deacon J, Harvey K, Minor J, Sassano A, et al. Comparison of surgery and compression with compression alone in chronic venous ulceration (ESCHAR study): randomised controlled trial. *Lancet*. 2004 Jun 5;363(9424):1854–9.
543. Kaiser N, Sasson S, Feener EP, Boukobza-Vardi N, Higashi S, Moller DE, et al. Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes*. 1993 Jan;42(1):80–9.
544. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Oct 24;97(22):12222–6.
545. Scivittaro V, Ganz MB, Weiss MF. AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C-beta(II) in neonatal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000 Apr;278(4):F676–683.
546. Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH, Brownlee M. Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest*. 2006 Apr;116(4):1071–80.
547. Ceradini DJ, Yao D, Grogan RH, Callaghan MJ, Edelstein D, Brownlee M, et al. Decreasing intracellular superoxide corrects defective ischemia-induced new vessel formation in diabetic mice. *J Biol Chem*. 2008 Apr 18;283(16):10930–8.
548. El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, Poci A, Jones PL, Roeder RG, et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med*. 2008 Sep 29;205(10):2409–17.
549. Dinh T, Veves A. Microcirculation of the diabetic foot. *Curr Pharm Des*. 2005;11(18):2301–9.

550. Veves A, Akbari CM, Primavera J, Donaghue VM, Zacharoulis D, Chrzan JS, et al. Endothelial dysfunction and the expression of endothelial nitric oxide synthetase in diabetic neuropathy, vascular disease, and foot ulceration. *Diabetes*. 1998 Mar;47(3):457–63.
551. Dewanjee S, Das S, Das AK, Bhattacharjee N, Dihingia A, Dua TK, et al. Molecular mechanism of diabetic neuropathy and its pharmacotherapeutic targets. *Eur J Pharmacol*. 2018 Aug 15;833:472–523.
552. Gao W, Ferguson G, Connell P, Walshe T, Murphy R, Birney YA, et al. High glucose concentrations alter hypoxia-induced control of vascular smooth muscle cell growth via a HIF-1alpha-dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Mar;42(3):609–19.
553. Ebenezer GJ, O'Donnell R, Hauer P, Cimino NP, McArthur JC, Polydefkis M. Impaired neurovascular repair in subjects with diabetes following experimental intracutaneous axotomy. *Brain*. 2011 Jun;134(Pt 6):1853–63.
554. Tarnuzzer RW, Schultz GS. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen*. 1996;4(3):321–5.
555. Wallace HJ, Stacey MC. Levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and soluble TNF receptors in chronic venous leg ulcers--correlations to healing status. *J Invest Dermatol*. 1998 Mar;110(3):292–6.
556. Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol*. 1993 Jul;101(1):64–8.
557. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010 Mar;89(3):219–29.
558. Morey M, O'Gaora P, Pandit A, Hélarý C. Hyperglycemia acts in synergy with hypoxia to maintain the pro-inflammatory phenotype of macrophages. *PLoS One*. 2019;14(8):e0220577.
559. Khanna S, Biswas S, Shang Y, Collard E, Azad A, Kauh C, et al. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS One*. 2010 Mar 4;5(3):e9539.
560. Möckesch B, Charlot K, Jumet S, Romana M, Divialle-Doumdo L, Hardy-Dessources MD, et al. Micro- and macrovascular function in children with sickle cell anaemia and sickle cell haemoglobin C disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2017 May;64:23–9.
561. Romana M, Reminy K, Moeckesch B, Charlot K, Hardy-Dessources MD, Doumdo L, et al. Loss of alpha globin genes is associated with improved microvascular function in patients with sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 2021 May 1;96(5):E165–8.
562. Hochleitner G, Sutor K, Levett C, Leyser H, Schlimp CJ, Solomon C. Revisiting Hartert's 1962 Calculation of the Physical Constants of Thrombelastography. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2017 Apr;23(3):201–10.
563. Waltz X, Hardy-Dessources MD, Lemonne N, Mougénel D, Lalanne-Mistrih ML, Lamarre Y, et al. Is there a relationship between the hematocrit-to-viscosity ratio and microvascular oxygenation in brain and muscle? *Clin Hemorheol Microcirc*. 2015;59(1):37–43.
564. Rab MAE, van Oirschot BA, Bos J, Kanne CK, Sheehan VA, van Beers EJ, et al. Characterization of Sickling During Controlled Automated Deoxygenation with Oxygen Gradient Ektacytometry. *J Vis Exp*. 2019 Nov 5;(153).

565. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018 Sep 1;39(33):3021–104.
566. Lamarre Y, Lalanne-Mistrih ML, Romana M, Lemonne N, Mougénel D, Waltz X, et al. Male gender, increased blood viscosity, body mass index and triglyceride levels are independently associated with systemic relative hypertension in sickle cell anemia. *PLoS One*. 2013;8(6):e66004.
567. Gordeuk VR, Sachdev V, Taylor JG, Gladwin MT, Kato G, Castro OL. Relative systemic hypertension in patients with sickle cell disease is associated with risk of pulmonary hypertension and renal insufficiency. *Am J Hematol*. 2008 Jan;83(1):15–8.
568. Conte MS, Bradbury AW, Kolh P, White JV, Dick F, Fitridge R, et al. Global Vascular Guidelines on the Management of Chronic Limb-Threatening Ischemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2019 Jul;58(1S):S1-S109.e33.
569. White RA, Nolan L, Harley D, Long J, Klein S, Tremper K, et al. Noninvasive evaluation of peripheral vascular disease using transcutaneous oxygen tension. *Am J Surg*. 1982 Jul;144(1):68–75.
570. Dowd GS, Linge K, Bentley G. Measurement of transcutaneous oxygen pressure in normal and ischaemic skin. *J Bone Joint Surg Br*. 1983 Jan;65(1):79–83.
571. Mustapha NM, Redhead RG, Jain SK, Wielogorski JW. Transcutaneous partial oxygen pressure assessment of the ischemic lower limb. *Surg Gynecol Obstet*. 1983 May;156(5):582–4.
572. Leenstra B, Wijnand J, Verhoeven B, Koning O, Teraa M, Verhaar MC, et al. Applicability of Transcutaneous Oxygen Tension Measurement in the Assessment of Chronic Limb-Threatening Ischemia. *Angiology*. 2020 Mar;71(3):208–16.
573. Humeau A, Steenbergen W, Nilsson H, Strömberg T. Laser Doppler perfusion monitoring and imaging: novel approaches. *Med Biol Eng Comput*. 2007 May;45(5):421–35.
574. Fouchard M, Misery L, Le Garrec R, Sigaudou-Roussel D, Fromy B. Alteration of Pressure-Induced Vasodilation in Aging and Diabetes, a Neuro-Vascular Damage. *Front Physiol*. 2019;10:862.
575. Holowatz LA, Thompson CS, Minson CT, Kenney WL. Mechanisms of acetylcholine-mediated vasodilatation in young and aged human skin. *J Physiol*. 2005 Mar 15;563(Pt 3):965–73.
576. Cracowski JL, Roustit M. Current Methods to Assess Human Cutaneous Blood Flow: An Updated Focus on Laser-Based-Techniques. *Microcirculation*. 2016 Jul;23(5):337–44.
577. Minson CT. Thermal provocation to evaluate microvascular reactivity in human skin. *J Appl Physiol* (1985). 2010 Oct;109(4):1239–46.
578. Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, et al. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2005 Jan;23(1):7–17.

579. Leslie SJ, Affolter J, Denvir MA, Webb DJ. Validation of laser Doppler flowmetry coupled with intra-dermal injection for investigating effects of vasoactive agents on the skin microcirculation in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003 Jun;59(2):99–102.
580. Roustit M, Cracowski JL. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol Sci.* 2013 Jul;34(7):373–84.
581. Catella J, Guillot N, Nader E, Skinner S, Poutrel S, Hot A, et al. Controversies in the pathophysiology of leg ulcers in sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2024 Jun 12;
582. Gillespie DL, Writing Group III of the Pacific Vascular Symposium 6, Kistner B, Glass C, Bailey B, Chopra A, et al. Venous ulcer diagnosis, treatment, and prevention of recurrences. *J Vasc Surg.* 2010 Nov;52(5 Suppl):8S-14S.
583. Van Way CW. Secondary Gain, Gone with the Wind & the SGR. *Mo Med.* 2014;111(3):160–1.
584. Davidhizar R. The pursuit of illness for secondary gain. *Health Care Superv.* 1994 Sep;13(1):10–5.
585. Okuyucu EE, Turhanoglu A, Duman T, Kaya H, Melek IM, Yilmazer S. Peripheral nervous system involvement in patients with sickle cell disease. *Eur J Neurol.* 2009 Jul;16(7):814–8.
586. Sadler KE, Lewis TR, Waltz TB, Besharse JC, Stucky CL. Peripheral nerve pathology in sickle cell disease mice. *Pain Rep.* 2019;4(4):e765.
587. Kaul DK, Liu X du, Chang HY, Nagel RL, Fabry ME. Effect of fetal hemoglobin on microvascular regulation in sickle transgenic-knockout mice. *J Clin Invest.* 2004 Oct 15;114(8):1136–45.
588. Aslan M, Canatan D. Modulation of redox pathways in neutrophils from sickle cell disease patients. *Exp Hematol.* 2008 Nov;36(11):1535–44.
589. Blaise S, Hellmann M, Roustit M, Isnard S, Cracowski JL. Oral sildenafil increases skin hyperaemia induced by iontophoresis of sodium nitroprusside in healthy volunteers. *Br J Pharmacol.* 2010 Jul;160(5):1128–34.
590. Klonizakis M, Yeung JMC, Nash JR, Lingam K, Manning G, Donnelly R. Effects of posture and venous insufficiency on endothelial-dependent and -independent cutaneous vasodilation in the perimalleolar region. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003 Jul;26(1):100–4.
591. Klonizakis M, Yeung JMC, Lingam K, Nash JR, Manning G, Donnelly R. Contrasting effects of varicose vein surgery on endothelial-dependent and -independent cutaneous vasodilation in the perimalleolar region. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006 Apr;31(4):434–8.
592. Tew GA, Gumber A, McIntosh E, Kesterton S, King B, Michaels JA, et al. Effects of supervised exercise training on lower-limb cutaneous microvascular reactivity in adults with venous ulcers. *Eur J Appl Physiol.* 2018 Feb;118(2):321–9.
593. Nguyen-Tu MS, Nivoit P, Oréa V, Lemoine S, Acquaviva C, Pagnon-Minot A, et al. Inflammation-linked adaptations in dermal microvascular reactivity accompany the development of obesity and type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond).* 2019 Mar;43(3):556–66.

594. Olerud JE, Pecoraro RE, Burgess EM, McKnight B, Wyss CR, Reiber GE, et al. Reliability of transcutaneous oxygen tension (TcPO₂) measurements in elderly normal subjects. *Scand J Clin Lab Invest*. 1987 Oct;47(6):535–41.
595. Nemeth AJ, Falanga V, Alstadt SP, Eaglstein WH. Ulcerated edematous limbs: effect of edema removal on transcutaneous oxygen measurements. *J Am Acad Dermatol*. 1989 Feb;20(2 Pt 1):191–7.
596. Posthauer ME, Banks M, Dorner B, Schols JMGA. The role of nutrition for pressure ulcer management: national pressure ulcer advisory panel, European pressure ulcer advisory panel, and pan pacific pressure injury alliance white paper. *Adv Skin Wound Care*. 2015 Apr;28(4):175–88; quiz 189–90.
597. Ashmore DL, Rashid A, Wilson TR, Halliday V, Lee MJ. Identifying malnutrition in emergency general surgery: systematic review. *BJS Open*. 2023 Sep 5;7(5):zrad086.
598. Dubert M, Elion J, Tolo A, Diallo DA, Diop S, Diagne I, et al. Degree of anemia, indirect markers of hemolysis, and vascular complications of sickle cell disease in Africa. *Blood*. 2017 Nov 16;130(20):2215–23.
599. Taylor JG, Nolan VG, Mendelsohn L, Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Chronic Hyper-Hemolysis in Sickle Cell Anemia: Association of Vascular Complications and Mortality with Less Frequent Vasoocclusive Pain. *PLoS One*. 2008 May 7;3(5):e2095.
600. Mikobi TM, Tshilobo PL, Aloni MN, Lelo GM, Akilimali PZ, Muyembe-Tamfum JJ, et al. Correlation between the Lactate Dehydrogenase Levels with Laboratory Variables in the Clinical Severity of Sickle Cell Anemia in Congolese Patients. *PLOS ONE*. 2015 May 6;10(5):e0123568.
601. Vissa M, Vichinsky E. Voxelotor for the treatment of sickle cell disease. *Expert Rev Hematol*. 2021 Mar;14(3):253–62.
602. Gøthgen I, Jacobsen E. Transcutaneous oxygen tension measurement II. The influence of halothane and hypotension. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*. 1978;67:71–5.
603. El Assar M, Angulo J, Vallejo S, Peiró C, Sánchez-Ferrer CF, Rodríguez-Mañas L. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. *Front Physiol*. 2012;3:132.
604. Gaubert ML, Sigaudou-Roussel D, Tartas M, Berrut G, Saumet JL, Fromy B. Endothelium-derived hyperpolarizing factor as an in vivo back-up mechanism in the cutaneous microcirculation in old mice. *J Physiol*. 2007 Dec 1;585(Pt 2):617–26.
605. Connes P, Möckesch B, Tudor Ngo Sock E, Hardy-Dessources MD, Reminy K, Skinner S, et al. Oxidative stress, inflammation, blood rheology, and microcirculation in adults with sickle cell disease: Effects of hydroxyurea treatment and impact of sickle cell syndrome. *Eur J Haematol*. 2021 Jun;106(6):800–7.
606. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *The Lancet*. 2010 Dec 11;376(9757):2018–31.
607. Ataga KI, Orringer EP. Hypercoagulability in sickle cell disease: a curious paradox. *Am J Med*. 2003 Dec 15;115(9):721–8.

608. Mohan JS, Lip GYH, Blann AD, Bareford D, Marshall JM. Endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilatation of the cutaneous circulation in sickle cell disease. *Eur J Clin Invest*. 2011 May;41(5):546–51.
609. Möckesch B, Connes P, Charlot K, Skinner S, Hardy-Dessources MD, Romana M, et al. Association between oxidative stress and vascular reactivity in children with sickle cell anaemia and sickle haemoglobin C disease. *Br J Haematol*. 2017 Aug;178(3):468–75.
610. Fromy B, Sigaudou-Roussel D, Gaubert-Dahan ML, Rousseau P, Abraham P, Benzoni D, et al. Aging-associated sensory neuropathy alters pressure-induced vasodilation in humans. *J Invest Dermatol*. 2010 Mar;130(3):849–55.
611. Christensen SL, Hansen RB, Storm MA, Olesen J, Hansen TF, Ossipov M, et al. Von Frey testing revisited: Provision of an online algorithm for improved accuracy of 50% thresholds. *Eur J Pain*. 2020 Apr;24(4):783–90.
612. Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest*. 2017 Mar 1;127(3):750–60.

REVIEW

Controversies in the pathophysiology of leg ulcers in sickle cell disease

Judith Catella^{1,2,3,4}   | Nicolas Guillot^{2,3} | Elie Nader^{2,3} | Sarah Skinner⁵ | Solène Poutrel^{1,2,3} | Arnaud Hot^{1,2,3} | Philippe Connes^{2,3}  | Berengère Fromy⁴

¹Service de Médecine Interne et Vasculaire, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

²Laboratoire d'Excellence du Globule Rouge (Labex GR-Ex), Sorbonne, Paris, France

³Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (LIBM) EA7424, Equipe "Biologie Vasculaire et du Globule Rouge", Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France

⁴Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (LBTI UMR 5305), CNRS/Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

⁵Clinical Research and Epidemiology Unit, Montpellier University, Montpellier, France

Correspondence

Judith Catella, Service de Médecine Interne et Médecine Vasculaire, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, 69003 Lyon, France.

Email: judith.catella@chu-lyon.fr

Summary

Patients with sickle cell disease (SCD) often experience painful vaso-occlusive crises and chronic haemolytic anaemia, as well as various acute and chronic complications, such as leg ulcers. Leg ulcers are characterized by their unpredictability, debilitating pain and prolonged healing process. The pathophysiology of SCD leg ulcers is not well defined. Known risk factors include male gender, poor social conditions, malnutrition and a lack of compression therapy when oedema occurs. Leg ulcers typically start with spontaneous pain, followed by induration, hyperpigmentation, blister formation and destruction of the epidermis. SCD is characterized by chronic haemolysis, increased oxidative stress and decreased nitric oxide bioavailability, which promote ischaemia and inflammation and consequently impair vascular function in the skin. This cutaneous vasculopathy, coupled with venostasis around the ankle, creates an ideal environment for local vaso-occlusive crises, which can result in the development of leg ulcers that resemble arterial ulcers. Following the development of the ulcer, healing is hindered as a result of factors commonly observed in venous ulceration, including venous insufficiency, oedema and impaired angiogenesis. All of these factors are modulated by genetic factors. However, our current understanding of these genetic factors remains limited and does not yet enable us to accurately predict ulceration susceptibility.

KEYWORDS

chronic wounds, leg ulcers, pathophysiology, sickle cell disease, treatment

INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) is an autosomal recessive genetic disorder secondary to a single mutation in the β -globin gene. Sickle cell anaemia (SCA; HbSS) is the most common and the most severe form of SCD.¹ Data from the United States, from 1989 to 2012, report that, for every 1941 newborn births screened, one case of SCD was identified and one of every 67 neonates screened was heterozygous for the beta-S allele.²

The primary mechanism at the origin of the complex SCD pathophysiology is HbS polymerization in deoxygenated conditions,³ which causes the sickling of red blood cells

(RBCs). Sickled RBCs are poorly deformable and very fragile, putting patients with SCD at risk for repeated painful vaso-occlusive crises and chronic haemolytic anaemia.⁴ Patients with SCD are not only at risk of developing various acute complications but may also develop chronic complications, including leg ulcers. Chronic leg ulceration in SCD has been associated with significant clinical and psychosocial morbidity⁵⁻⁷ and an increased risk of early death.⁸ Prevalence of chronic leg ulcers among individuals with SCD varies from 1.4% in Brazil to 29.5% in Jamaica.⁹⁻¹³

In order to improve the management and care of SCD leg ulcers, the mechanisms behind their occurrence must be

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2024 The Author(s). *British Journal of Haematology* published by British Society for Haematology and John Wiley & Sons Ltd.

better understood. In this review, we aim to explore several contentious aspects of the current understanding of leg ulcer pathophysiology in SCD and examine potential factors contributing to their delayed healing.

SCD ULCERS START MOSTLY LIKE AN ISCHAEMIC ULCER

Ulcerations in SCD are likely caused by local vaso-occlusive crises, resulting in cutaneous microvascular infarctions. The majority of SCD ulcerations manifest spontaneously, without any associated trauma.⁵ Patients usually experience the initial symptom of spontaneous pain, followed by induration, hyperpigmentation or subcutaneous necrosis, blister formation and destruction of the epidermis.⁵ In some patients, leg ulcers may occur after minor trauma or scratching.^{5,14} However, irrespective of the mode of onset, the progression of the ulcer tends to follow a similar course.⁵

General conditions

Several studies reported a high incidence of leg ulcers in males compared to females with SCD.^{11,15,15–18} The male to female ratio was approximately 2 in the United States and Nigeria.^{16,17} In contrast, other studies reported a similar incidence between males and females.^{9,12,15,19} Thus, no clear conclusion about the effect of gender on ulceration can be drawn from the literature.

In addition, it has been observed that patients with leg ulcers tend to have poorer social conditions.¹⁰ Cumming et al. reported that, in a Jamaican cohort of individuals with SCD, 85% of patients with leg ulcers were below the poverty line, whereas only 46% of those without leg ulcers fell below the poverty line.⁹ It remains challenging to determine whether the incidence of leg ulcers is related to housing or working conditions. As discussed below, oedema can delay healing,²⁰ and factors such as prolonged standing or sleeping in a seated position can exacerbate oedema.²¹ SCD patients with leg ulcers should be questioned about their living conditions (Figure 1). Physicians should emphasize the importance of leg care to their patients and specify that if oedema occurs, they should elevate their legs whenever possible to prevent leg ulcers and minimize healing delays. Depending on the country in question, social workers may have varying capacities to assist SCD patients with housing conditions and financial support.

In SCD patients, poor social conditions may also contribute to malnutrition. Malnutrition, which can be characterized by a low serum albumin level¹⁹ or a low body mass index (BMI),^{11,19} has been linked to the occurrence of leg ulcers in SCD patients. In general, malnutrition, a common factor among patients suffering from wounds,²² may precede the appearance of ulcers and promote wound development or appear during the healing process. The importance of nutritional management has been well established in other types of chronic wounds²³ and is likely fundamental in treating leg ulcers in SCD patients. It is important to note that nephropathy or liver disease may also contribute to a low

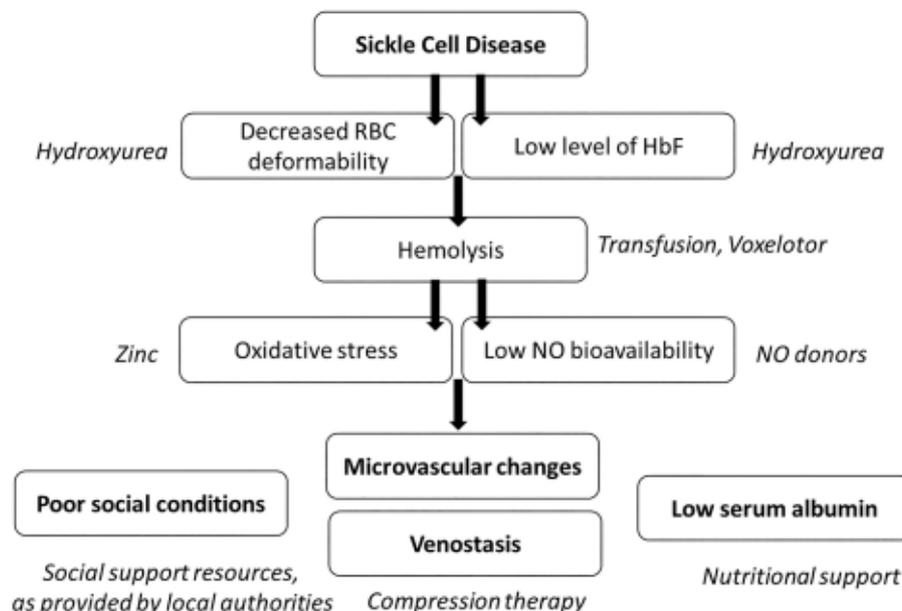


FIGURE 1 Treatments focusing on some of the mechanisms involved in leg ulcer occurrence in sickle cell disease patients.^{14,40,44,98,110,119,120}

serum albumin level.^{24,25} Therefore, laboratory tests should include measurements of albumin and pre-albumin to check for malnutrition, as well as creatinine, ALT (alanine amino transferase), ASAT (aspartate amino transferase), GGT (gamma glutamyl transferase) and alkaline phosphatase to screen for the presence of glomerulopathy and liver disease (Figure 1).

Vascular modifications

Microvascular changes can lead to inadequate tissue perfusion, an important factor in the development of chronic wounds and delayed healing. In SCD patients, microscopic examination of leg ulcer beds has revealed evidence of vasculopathy.¹⁵ This includes activated capillary endothelium, signs of thrombosis/recanalization and neovascularization around occluded capillaries^{15,26} and inflammation.¹⁵ The progression of these microvasculopathies varies depending on the patient's age, although the first ulcers may appear as early as age 10.^{5,9,12,27}

Additionally, capillary blood stasis and venostasis have been observed through microscopic examination¹⁵ and laser Doppler.²⁸ Venostasis is favoured by the abolition of the venoarteriolar reflex and cardiovascular autonomic dysfunction.²⁹ The resulting pressure from venostasis is greatest in the peri-malleolar region, which is the primary site for SCD leg ulcers.^{5,30} Stasis may also facilitate local sickling due to prolonged exposure of RBC to hypoxia and local vaso-occlusive crisis, increasing the risk of leg ulcer development.³¹ There is no evidence to support the efficacy of compression therapy with socks on leg ulcers in the absence of oedema (Figure 1). When legs are in a hanging position, inappropriate vasoconstriction has been observed around SCD ulcers,³² which could potentially contribute to delayed healing. Macrovascular abnormalities have also been observed in SCD patients with leg ulcers, suggesting involvement of diffuse vasculopathy, including increased intima media thickness in the femoral arteries.³³

The following sections will focus on the proposed mechanisms underlying vasculopathy in both the macro- and microcirculation.

Haemolysis

Sickle RBCs are prone to lysis³⁴ and the extent of haemolysis has been associated with the occurrence of leg ulcers.³⁵ Common markers of haemolysis in SCD patients with leg ulcers are high levels of LDH, bilirubin, aspartate aminotransferase and reticulocytes, concomitant with low haemoglobin levels.^{10,11,19,36,37} A recent study conducted in Senegal and Mali and that included 235 SCD adults found no difference in LDH and bilirubin levels between those with and without leg ulcers,³⁸ suggesting that haemolysis may not be the sole contributing factor to leg ulcer development, particularly in regions where clinical management and therapeutic options

differ from those in developed countries. Nevertheless, Minniti et al. observed clinical improvement in leg ulcers among SCD patients participating in the phase III, randomized, double-blinded, placebo-controlled, HOPE trial (NCT03036813), which evaluated the effects of Voxelotor.³⁹ Voxelotor is a novel molecule that inhibits HbS polymerization by increasing the affinity of HbS to oxygen (Figure 1). Voxelotor has been shown to reduce haemolysis and increase haemoglobin levels.⁴⁰ A new randomized controlled trial (RCT) called RESOLVE is currently recruiting SCD patients to specifically study the effect of Voxelotor on leg ulcer healing (NCT05561140).

Haemolysis results in reduced nitric oxide (NO) bioavailability⁴¹ and aberrant vascular activity, leading to tissue ischaemia and ulcer formation.^{15,42} In SCD patients with leg ulcers, Landburg et al. observed the elevated levels of asymmetric dimethylarginine, an inhibitor of NO synthase released during haemolysis.⁴³ Minniti et al. observed increased peri-wound cutaneous blood flow measured by laser speckle contrast imaging and infrared thermography in 18 SCD patients with leg ulcers after applying a topical NO donor.⁴⁴ Moreover, leg ulcer size and pain decreased in a dose-dependent manner (Figure 1). Ulcers healed completely in three patients who received the highest concentrations of topical sodium nitrite cream (1.8% and 2%). A phase II study is ongoing in SCD patients with leg ulcers (NCT02863068).

Reduced NO bioavailability is also associated with increased inflammation.^{45,46} Pathologists have observed an inflammatory infiltration of white blood cells in SCD ulcer tissues.^{15,26,47} The plasma levels of several pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-15) were found to be significantly elevated in the serum of SCD patients with leg ulcers compared to those without.^{48–50} In an attempt to control the inflammatory process, the anti-inflammatory cytokine IL-10 level was shown to be increased in the plasma⁵¹ and in cultures of peripheral blood mononuclear cells of SCD patients with leg ulcers compared to those without.⁵²

In SCD, the most rigid RBCs are also the most fragile.³⁴ Therefore, a greater impairment in RBC deformability likely accounts for the increased haemolysis in patients with leg ulcers.^{53–55} The reduced RBC deformability could decrease tissue oxygenation and participate in leg ulcer onset.^{53–55}

Lastly, the percentage of fetal haemoglobin (HbF) determines the propensity of RBCs to sickle upon deoxygenation.⁵⁶ Thus, any factors/mechanisms that may stimulate the production of HbF may decrease haemolysis and modulate the clinical expression of SCD.⁵⁶ A number of studies have highlighted the association between low HbF levels and leg ulcer development.^{9,27,37,57,58}

HU is the most common drug used to treat SCD patients. HU improves anaemia by increasing HbF expression, which decreases HbS and its polymerization under deoxygenated conditions, thus reducing haemolysis.⁵⁹ Indeed, HU reduces RBC sickling and fragility.⁵⁹ The clinical experience with HU in patients with leg ulcers is paradoxical. While it may be expected that HU would reduce leg ulcer incidence, the literature reports several cases of leg

ulcers in patients treated with HU.⁶⁰⁻⁶³ Soya et al. reported a case of an SCD patient who developed a leg ulcer 18 days after the introduction of HU and healed after HU was stopped.⁶⁴ The authors proposed that the accumulation of HU under the skin could have caused cutaneous atrophy and impaired microcirculation.⁶⁴ An alternate hypothesis could be that the level of HbF reached during HU treatment was not enough to provide clinical benefits. Recently, Tolu et al. identified that an HbF level >25% would be necessary to limit leg ulcer development in SCD patients treated with HU,⁶⁵ a level rarely achieved. However, data from the ESCORT-HU study (a Phase IV observational cohort study including 1906 SCD patients treated with HU to the study safety profile) are reassuring. In this study, leg ulcers were reported in only 33 patients, corresponding to an incidence of 1.73%.⁶⁶ ESCORT-HU extension is currently recruiting to improve knowledge about HU and leg ulcers (NCT04707235).

Two biological/clinical phenotypes have been distinguished in SCD. One phenotype is characterized by the presence of high viscosity, which increases the risk for painful vaso-occlusive crisis, acute chest syndrome and osteonecrosis.^{35,67} The other phenotype, called the haemolytic-endothelial dysfunction phenotype, is characterized by more severe haemolysis, which leads to the development of progressive vasculopathy, and an increased risk of leg ulcers, priapism, cerebral vasculopathy, glomerulopathy and pulmonary hypertension. Many studies have shown an association between leg ulcers and echocardiographic signs of pulmonary hypertension.^{13,19,68,69} Parent et al. confirmed these results using right heart catheterization,⁷⁰ the gold standard for pulmonary hypertension diagnosis. These observations support systematic screening of pulmonary hypertension in SCD patients with leg ulcers. In addition, Nolan et al.^{36,71} and others^{10,15} have identified an association between leg ulcers and priapism.

Genetic studies

Haemoglobin genotypes, co-existing α -thalassaemia and β^S haplotypes

Powars et al. hypothesized that each SCD patient has a predetermined rate of disease progression,⁷² with genetic factors dominating the biological calendar that controls vasculopathy development (Figure 2).⁷² Four region-specific African haplotypes (Senegal, Benin, Bantu also called CAR β for Central African Republic and Cameroon haplotypes) and the Arab-India haplotype have been defined.⁷³ The CAR β haplotype has been associated with a higher incidence of soft tissue organ failure (including central nervous system, kidney, lung and leg ulcers).⁷² However, Powars et al.⁷² were the only authors to report this association, and the haplotype characterization is not systematic in SCD centres worldwide. In the Nolan study, the β^S haplotypes were not associated with leg ulcers.³⁶

Haemolytic rate also depends on haemoglobin genotype, with HbSS and HbS β^0 patients exhibiting higher level of haemolysis. Indeed, it is not surprising to observe more leg ulcers in these patients than in HbS β^+ and HbSC patients.^{5,11,27,72} Moreover, since the coexistence of α -thalassaemia modulates the degree of haemolysis, some studies logically found that patients with 2 α -gene deletions have a lower risk of developing leg ulcers.^{27,36,74} Other studies failed to find an association between leg ulcer incidence and α -thalassaemia.^{9,19,55,75} Minniti et al. proposed that these apparently conflicting results could be due to the small number of subjects with α -thalassaemia in certain studies, resulting in low statistical power, which reduces the chances of detecting a true effect.¹⁹ Thus, SCD patients without α -thalassaemia may be at an increased risk of developing leg ulcers and should be advised to consult their doctor immediately if they incur an ankle wound.

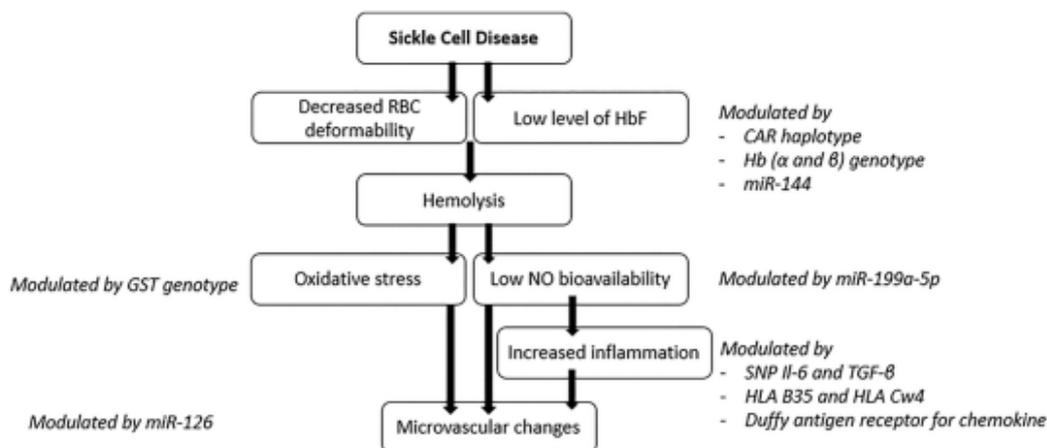


FIGURE 2 Reported genetic associations with some mechanisms involved in leg ulcer occurrence in SCD patients. GST, glutathione S transferase.

Immunity

Human leucocyte antigens (HLA) constitute a complex genetic system that encodes proteins which predominantly regulate immune/inflammatory processes. The relative risk of developing leg ulcers in SCD patients who had both HLA-B35 and HLA-Cw4 was found to be 17 times higher compared to patients without these HLAs.⁷⁶ These results suggest that genetic factors from the HLA system may contribute to the development of leg ulcers in SCD patients.⁷⁶ HLA-B35 has been linked to increased susceptibility to apoptosis⁷⁷ and endothelial dysfunction through higher production of endothelin-1 (ET-1).⁷⁸ However, the causal relationship remains elusive.

Humoral immunity may also play a role in leg ulcer risk. Namely, a single nucleotide polymorphism (SNP) of *IL6* has been proposed as a potential risk factor for leg ulcers.⁵⁰ The influence of the Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) has also been studied in the context of SCD. DARC modulates the inflammatory process depending on its expression level. While some studies did not report any association between the occurrence of leg ulcers and DARC expression,^{79,80} Drasar et al. found an increased incidence of leg ulcers when DARC expression was high.⁸¹ It has been suggested that DARC could play a role in the recruitment of white blood cells that could participate to vascular occlusion and initiate leg ulcers.⁸¹ These findings corroborate the high level of inflammation in and around the leg ulcers mentioned above. However, there is currently no treatment targeting inflammation.

miRNA

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs involved in post-transcriptional gene repression by influencing messenger RNA (mRNA).⁸² The processing of primary miRNA transcripts into mature miRNAs is a regulated multistep process, and its deregulation is often associated with human diseases.⁸³

Increased expression of circulating miR-199a-5p and miR-144 has been reported in SCD patients with leg ulcers, while miR-126 expression was reduced.^{84,85} MiR-199a-5p has been shown to regulate NO production by endothelial NO-synthase in vitro⁸⁶ and may also have a regulatory role in cardiomyocytes,⁸⁷ cancer cell proliferation⁸⁸ and bile acid efflux transport.⁸⁹ MiR-144 may regulate various processes such as HbF production through gene silencing,⁸⁶ as well as cancer cell proliferation⁹⁰ and asthma.⁹¹ Lastly, miR-126, which is highly expressed in endothelial cells, plays a key role in maintaining vascular integrity and promoting angiogenesis.⁹² It is also involved in autoimmune disorders⁹³ and can be elevated by physical exercise.⁹³ Therefore, although miRNAs are considered promising biomarkers for certain pathologies, these miRNAs lack specificity and cannot be used to predict the occurrence of leg ulcers in SCD. Additionally, the regulation of miRNA involves both genetic and epigenetic factors. miRNAs interact with redox

regulation: Redox changes influence the expression of miRNAs, while miRNAs, in turn, modify the expression of redox regulators,⁹⁴ which is particularly relevant in the context of SCD. Isolating haemolysis, oxidative stress or other factors can be challenging when studying leg ulcers because these factors often interact in a complex manner, creating a 'domino' or even a 'vicious cycle' effect.

Oxidative stress

Gene regulators of oxidative stress have been studied in the context of SCD and leg ulcers. Glutathione S-transferases (GSTs) display peroxidase activity and may protect from oxidative damage. GSTs are dimeric units and, based on amino acid sequence, are described in seven classes: alpha, mu, pi, sigma, theta, omega and zeta.⁹⁵ The theta category includes GSTT1 and GSTT2 isoforms that exhibit a high activity in human RBCs. The genes encoding the Mu class (GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 and GSTM5) appear to be active in hepatocytes and are known to be highly polymorphic. De Oliveira Filho et al. showed that patients with a GSTM1 null genotype had a 6.9-fold increased risk of leg ulcers, and patients with a GSTT1 null genotype had a 5.2-fold increased risk of leg ulcers.⁹⁶ These findings suggest that oxidative stress probably plays a role in leg ulcer pathophysiology in SCD patients. However, L-carnitine, an antioxidant, did not shorten leg ulcer healing duration in 15 SCD patients.⁹⁷ Furthermore, in a controlled trial on the effect of oral zinc sulphate in healing SCD leg ulcers, the healing rate in the treated group was three times faster than in the placebo group.⁹⁸ This study was not randomized and thus excluded from the last Cochrane systematic review on interventions for treating SCD leg ulcers.⁹⁹ However, since about one-third of SCD patients with leg ulcers have low zinc levels, Eckman proposed that all patients with active or healed ulcers should be supplemented with zinc sulphate at a dose of 220 mg administered orally three times a day.¹⁴ Zinc is an antioxidant that inhibits lipid peroxidation in RBCs, protecting the human body against oxidative stress. In addition, the oxidative stress associated with chronic haemolysis in SCD increases the demand for zinc¹⁰⁰ (Figure 1).

Furthermore, Nolan et al. studied 215 SNPs in more than 100 candidate genes selected for their potential role in SCD pathophysiology.³⁶ These included genes involved in inflammation, oxidative stress, NO biology, vasoregulation, cell-cell interaction, blood coagulation, haemostasis and growth factors. After considering a false discovery rate of 10%, only one SNP, adjacent to *SMAD7*, remained significantly associated with leg ulcers. *SMAD7* is part of the TGF- β pathway. Among its many roles, this pathway impacts cell proliferation, apoptosis, response to tissue injury, endothelial growth, inflammation, immune regulation and extracellular matrix synthesis.¹⁰¹ Although not firmly demonstrated, the TGF- β pathway could play a role in SCD leg ulcer pathophysiology. However, these results do not currently have any practical application for leg ulcer prediction and treatment.

Factors influencing healing

Genetic factors have been shown to play a role in granulation and epithelialization defects in SCD patients. Overexpression of miR-130a has been associated with chronic venous ulcers and dysregulated re-epithelization processes, granulation tissue formation and wound healing.¹⁰² MiR-130a overexpression was four times higher in SCD patients with ulcers compared to those without ulcers, suggesting miR-130a may play an important role in this complication.¹⁰³

de Carvalho-Siqueira et al. used whole exome sequencing to identify new candidate genes and found only one variant in the *FLG2* gene associated with leg ulcers in SCD patients.¹⁰⁴ This gene has been observed in persistent atopic dermatitis in African Americans and could be involved in leg ulcer development by promoting alterations in the skin barrier. At present, this finding could open a new way of understanding SCD leg ulcer pathophysiology.

At present, there is no published data using the most recent genetic approach, the genome-wide association study (GWAS). GWAS does not require any prior gene selection and allows for the study of exon and intron sequences. GWAS could be useful in identifying or confirming the involvement of genetic factors in leg ulcer mechanisms.

DELAYED HEALING OF SCD ULCERS, MAINLY VENOUS ULCERS

The second part of our review will focus on other common mechanisms shared with venous ulcers, which contribute more to healing delays than to initial ulcer occurrence (Figure 3).

In a French cohort of SCD patients, leg ulcer area < 8 cm² (odds ratio (OR) 6.73, 95% CI 2.35–19.31; $p < 0.001$) and duration < 9 weeks (OR 3.19, 95% CI 1.16–8.76; $p = 0.024$) were independently associated with wound healing at week 24 in 98 SCD patients. This study highlights that healing is more difficult in older and larger leg ulcers than in recent ones. However, it is unknown whether the natural course of these leg ulcers could have been predicted from ulcer onset or

whether the poor healing prognosis results from excessively long delay in initiating treatment. Notably, no association between wound healing and biological markers of haemolysis, HbF or other complications of SCD has been observed.¹⁰⁵

Venous involvement

Tan et al. observed haemosiderin, an iron storage complex, in the edge of the ulcers of SCD patients. The burden of haemosiderin was between the levels found in ischaemic ulcers and venous ulcers in non-SCD patients. This observation supports the idea that the pathophysiology of SCD ulcers involves both ischaemic and venous components.¹⁰⁶

Venous insufficiency

We previously highlighted the role of venostasis in the occurrence of leg ulcers in SCD patients. Venous insufficiency is also involved in delaying wound healing. Early observations indicated that bed rest promotes ulcer healing in SCD patients, suggesting that venous hyperpressure may contribute to ulcer healing delay by causing oedema.⁵ Venous hyperpressure has been evidenced by Saad and Zago, who measured the clearance (% decrease/min) of ^{99m}Tc, in SCD patients with leg ulcers to demonstrate that their calf muscle blood flow was impaired.¹⁰⁷ Additionally, Billet et al. and Mohan et al. observed rapid refill times using venous pulse recordings, venous plethysmography and laser Doppler flowmetry in SCD patients with leg ulcers compared to those without.^{32,108} To better understand the origin of venous hyperpressure, venous incompetency has been studied.

Venous incompetency

Venous hypertension is commonly associated with venous insufficiency, caused by poorly functioning incompetent venous valves. Venous incompetency can be diagnosed using Doppler duplex ultrasound to detect venous. Clare



FIGURE 3 Sickle cell disease leg ulcer natural history. Sickle leg ulcer starts as arterial due to sickling, microvascular occlusion and local hypoxia. Once the ulcer is present, venostasis and impaired angiogenesis delay healing.

et al. found an increased risk of leg ulceration in SCD patients with venous incompetency, with a hazard ratio of 2.59 (95% confidence interval (CI): 2.39–2.79, $p < 0.001$).¹⁰⁹ Similarly, Cumming et al. observed a hazard ratio of 4.87 (CI: 2.09–11.03, $p < 0.001$).⁹ These data indicate that venous incompetency may contribute to the development of leg ulcers in SCD patients, but is not always present prior to ulcer onset.

Clinical application

Further investigation is required to elucidate the correlation between leg oedema and the onset of leg ulcers. Our proposed explanation is that dysfunction of the local venous and lymphatic systems render them unable to effectively manage the increased blood flow in the ulcerated area, contributing to delayed healing. The application of compression therapy is deemed essential in all SCD patients with leg ulcers, regardless of venous incompetency status.¹¹⁰ However, the question remains whether routine Doppler duplex ultrasound should be universally adopted for all SCD patients, with and without leg oedema, to screen for venous incompetency. For those SCD patients exhibiting venous incompetency, the implementation of compression therapy could serve as a preventive measure against the development of initial leg ulcers. Nevertheless, encouraging compliance in asymptomatic patients might pose a challenge.

Bacterial colonization

Bacterial colonization of leg ulcer area is an expected phenomenon that does not need to be treated by systematic or local antibiotic therapy, unless signs of local infection are present. *Staphylococcus Aureus* has been reported to be the most common bacterium present in SCD leg ulcers,^{58,111–115} as is the case in other types of ulcers.¹¹⁵ However, high microbial diversity (driven by aerobes such as *Corynebacterium* and *Alcaligenes*, and anaerobes, including *Anaerococcus*, *Peptoniphilus* and *Porphyromonas*) has been shown to delay leg ulcer healing compared to patients with less microbial diversity and a predominance of *Staphylococcus Aureus* only.¹¹⁵ On intact skin, Byeon et al. have found elevated ratios of *Corynebacterium*:*Lactobacillus* and *Staphylococcus*:*Lactobacillus* in SCD individuals with a history of leg ulcers. As no samples were collected before leg ulcer occurrence, these ratios may reflect a susceptibility to leg ulcers or consequences of healed leg ulcers. In addition, the ratio of *Lactobacillus*:*Bacillus* was elevated in SCD individuals without a history of leg ulcers. *Lactobacillus* is involved in a range of protective mechanisms against cutaneous infection or delayed healing, including immune modulation, promotion of re-epithelialization and pathogen clearance.¹¹⁶ These results, if confirmed in larger studies, could be used to target specific therapy.

Impaired angiogenesis

Nguyen et al. previously investigated wound healing differences in sickle SAD and healthy mice.¹¹⁷ They found decreased keratinocyte and fibroblast proliferation, and lower numbers of endothelial cells in SAD mice compared to healthy mice. The proliferation and mobilization of bone marrow endothelial progenitor cells were also decreased. Injecting endothelial progenitor cells into the wound shortened the healing process by promoting epidermal cell proliferation and angiogenesis. CXCL12, IL-6, VEGF A, VEGFR-2, Tie-1, Tie-2 and CXCR4 secretion was lower in the wounds of SAD mice compared to healthy mice. Interestingly, the injection of CXCL12 (a chemokine known to promote angiogenesis) also shortened the healing process.¹¹⁷ This study highlighted the well-known basal vasculopathy and impaired angiogenesis due to alterations in endothelial progenitor recruitment present in SCD. Focusing on this alteration in progenitor recruitment, autologous stem-cell therapy has been tested in 23 SCD patients with leg ulcers with promising results.¹¹⁸ However, there are no ongoing studies evaluating stem-cell therapy in a larger population.

CONCLUSION

Leg ulcers in SCD constitute a distinct category of chronic wounds with a complex and multifactorial pathophysiology that feature mechanisms commonly observed in both arterial and venous ulcers. Local vaso-occlusive crisis could trigger leg ulceration in vulnerable cutaneous areas due to underlying venostasis. Several factors may modulate the appearance of leg ulcers and healing processes, with genetic factors offering novel research opportunities to improve our understanding of the pathophysiology of this complication.

ACKNOWLEDGEMENTS

JC, NG, BF and PC wrote the paper. EN, SP and AH corrected the paper. SS revised manuscript.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

All authors have no conflict of interest disclosure.

ORCID

Judith Catella  <https://orcid.org/0000-0001-8028-6827>

TWITTER

Judith Catella  judithcatella

Philippe Connes  connesphilippe

REFERENCES

1. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2010;376(9757):2018–31.
2. Therrell BL, Lloyd-Puryear MA, Eckman JR, Mann MY. Newborn screening for sickle cell diseases in the United States: a review of data spanning 2 decades. *Semin Perinatol*. 2015;39(3):238–51.
3. Pauling L, Itano HA. Sickle cell anemia a molecular disease. *Science*. 1949;110(2865):543–8.

4. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):1–22.
5. Serjeant GR. Leg ulceration in sickle cell anemia. *Arch Intern Med*. 1974;133(4):690–4.
6. Alleyne SI, Wint E, Serjeant GR. Psychosocial aspects of sickle cell disease. *Health Soc Work*. 1976;1(4):104–19.
7. Alleyne SI, Wint E, Serjeant GR. Social effects of leg ulceration in sickle cell anemia. *South Med J*. 1977;70(2):213–4.
8. Powars DR, Chan LS, Hiti A, Ramicone E, Johnson C. Outcome of sickle cell anemia: a 4-decade observational study of 1056 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2005;84(6):363–76.
9. Cumming V, King L, Fraser R, Serjeant G, Reid M. Venous incompetence, poverty and lactate dehydrogenase in Jamaica are important predictors of leg ulceration in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2008;142(1):119–25.
10. Olatunya OS, Albuquerque DM, Adekile AD, Costa FF. Evaluation of sociodemographic, clinical, and laboratory markers of sickle leg ulcers among young Nigerians at a tertiary health institution. *Niger J Clin Pract*. 2018;21(7):882–7.
11. Antwi-Boasiako C, Andemariam B, Colombatti R, Asare EV, Strunk C, Piccone CM, et al. A study of the geographic distribution and associated risk factors of leg ulcers within an international cohort of sickle cell disease patients: the CASiRe group analysis. *Ann Hematol*. 2020;99(9):2073–9.
12. Spira JAO, Borges EL, Guedes ACM, Andrade PGR, Lima VL. Prevalence of people with sickle cell disease and leg ulcers in Brazil: socioeconomic and clinical overview. *PLoS One*. 2022;17(9):e0274254.
13. Madu A, Madu K, Anigbogu I, Ugwu AO, Okwulehie VA, Ololo U, et al. Phenotypic characterisation and associations of leg ulcers in adult sickle cell patients. *Wound Repair Regen*. 2022;30(1):126–31.
14. Eckman JR. Leg ulcers in sickle cell disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1996;10(6):1333–44.
15. Minniti CP, Delaney KMH, Gorbach AM, Xu D, Lee CCR, Malik N, et al. Vasculopathy, inflammation, and blood flow in leg ulcers of patients with sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 2014;89(1):1–6.
16. Durosinmi MA, Gevao SM, Esan GJ. Chronic leg ulcers in sickle cell disease: experience in Ibadan. *Nigeria Afr J Med Sci*. 1991;20(1):11–4.
17. Delaney KMH, Axelrod KC, Buscetta A, Hassell KL, Adams-Graves PE, Seamon C, et al. Leg ulcers in sickle cell disease: current pattern and practices. *Hemoglobin*. 2013;37(4):325–32.
18. Reis de Souza V, Kelly S, Cerdeira Sabino E, Mendes de Oliveira F, Silva T, Miranda Teixeira C, et al. Factors associated with leg ulcers in adults with sickle cell disease in Brazil. *Adv Skin Wound Care*. 2023;36(2):98–105.
19. Minniti CP, Taylor JG, Hildesheim M, O'Neal P, Wilson J, Castro O, et al. Laboratory and echocardiography markers in sickle cell patients with leg ulcers. *Am J Hematol*. 2011;86(8):705–8.
20. Shi C, Dumville JC, Cullum N, Connaughton E, Norman G. Compression bandages or stockings versus no compression for treating venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021;7(7):CD013397.
21. Zhang H, Yang Z. Research on dynamic comfort maintenance by measuring lower limb oedema and seat pressure during simulated seated sleep in flight. *Int J Occup Saf Ergon*. 2024;30(1):72–83.
22. Molnar JA, Underdown MJ, Clark WA. Nutrition and chronic wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3(11):663–81.
23. Stechmiller JK. Understanding the role of nutrition and wound healing. *Nutr Clin Pract*. 2010;25(1):61–8.
24. Ataga KI, Saraf SL, Derebail VK. The nephropathy of sickle cell trait and sickle cell disease. *Nat Rev Nephrol*. 2022;18(6):361–77.
25. Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest*. 2017;127(3):750–60.
26. Serjeant GR, Serjeant BE, Mohan JS, Clare A. Leg ulceration in sickle cell disease: medieval medicine in a modern world. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2005;19(5):943–56.
27. Koshy M, Entsuh R, Koranda A, Kraus AP, Johnson R, Bellvue R, et al. Leg ulcers in patients with sickle cell disease. *Blood*. 1989;74(4):1403–8.
28. Gniadecka M, Gniadecki R, Serup J, Søndergaard J. Microvascular reactions to postural changes in patients with sickle cell anaemia. *Acta Derm Venereol*. 1994;74(3):191–3.
29. Oguanobi N, Onwubere B, Anisiuba B, Ike S, Ejim E, Ibegbulam O. Clinical findings associated with cardiovascular autonomic dysfunction in adult sickle cell anaemia patients. *Acta Cardiol*. 2012;67:169–75.
30. Hassan A, Gayus GL, Abdulrasheed I, Umar MA, Ismail DL, Babadoko AA. Chronic leg ulcers in sickle cell disease patients in Zaria. *Nigeria Arch Int Surg*. 2014;4(3):141–5.
31. Gabuzda TG. Sickle cell leg ulcers: current pathophysiologic concepts. *Int J Dermatol*. 1975;14(5):322–5.
32. Mohan JS, Marshall JM, Reid HL, Thomas PW, Serjeant GR. Postural vasoconstriction and leg ulceration in homozygous sickle cell disease. *Clin Sci (Lond)*. 1997;92(2):153–8.
33. Ayoola OO, Bolarinwa RA, Onakpoya UU, Adedeji TA, Onwuka CC, Idowu BM. Intima-media thickness of the common femoral artery as a marker of leg ulceration in sickle cell disease patients. *Blood Adv*. 2018;2(22):3112–7.
34. Connes P, Lamarre Y, Waltz X, Ballas SK, Lemonne N, Etienne-Julan M, et al. Haemolysis and abnormal haemorrhology in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2014;165(4):564–72.
35. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*. 2007;21(1):37–47.
36. Nolan VG, Adewoye A, Baldwin C, Wang L, Ma Q, Wyszynski DF, et al. Sickle cell leg ulcers: associations with Haemolysis and SNPs in klotho, TEK and genes of the TGF- β /BMP pathway. *Br J Haematol*. 2006;133(5):570–8.
37. Bartolucci P, Brugnara C, Teixeira-Pinto A, Pissard S, Moradkhani K, Jouault H, et al. Erythrocyte density in sickle cell syndromes is associated with specific clinical manifestations and hemolysis. *Blood*. 2012;120(15):3136–41.
38. Ranque B, Diaw M, Dembele AK, Lapoumeroulie C, Offredo L, Tessougou O, et al. Association of haemolysis markers, blood viscosity and microcirculation function with organ damage in sickle cell disease in sub-Saharan Africa (the BIOCADRE study). *Br J Haematol*. 2023;203(2):319–26.
39. Minniti CP, Knight-Madden J, Tonda M, Gray S, Lehrer-Graiwer J, Biemond BJ. The impact of voxelator treatment on leg ulcers in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2021;96(4):E126–E128.
40. Vissa M, Vichinsky E. Voxelator for the treatment of sickle cell disease. *Expert Rev Hematol*. 2021;14(3):253–62.
41. Chirico EN, Pialoux V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life*. 2012;64(1):72–80.
42. Trent JT, Kirsner RS. Leg ulcers in sickle cell disease. *Adv Skin Wound Care*. 2004;17(8):146–410.
43. Landburg PP, Teerlink T, Biemond BJ, Brandjes DPM, Muskiet FAJ, Duits AJ, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in sickle cell disease are related to the hemolytic phenotype. *Blood Cell Mol Dis*. 2010;44(4):229–32.
44. Minniti CP, Gorbach AM, Xu D, Hon YY, Delaney KM, Seidel M, et al. Topical sodium nitrite for chronic leg ulcers in patients with sickle cell anaemia: a phase 1 dose-finding safety and tolerability trial. *Lancet Haematol*. 2014;1:e95–e103.
45. Riddell DR, Owen JS. Nitric oxide and platelet aggregation. *Vitam Horm*. 1997;57:25–48.
46. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*. 1995;96(1):60–8.

47. Francillon YJ, Jilly PN, Varricchio F, Castro O. Histochemical analysis of growth factor, fibronectin, and iron content of sickle cell leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 1996;4(2):240–3.
48. Bowers AS, Reid HL, Greenidge A, Landis C, Reid M. Blood viscosity and the expression of inflammatory and adhesion markers in homozygous sickle cell disease subjects with chronic leg ulcers. *PLoS One.* 2013;8(7):e68929.
49. Domingos IF, Pereira-Martins DA, Sobreira MJVC, Oliveira RTD, Alagbe AE, Lanaro C, et al. High levels of proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8 are associated with a poor clinical outcome in sickle cell anemia. *Ann Hematol.* 2020;99(5):947–53.
50. Vicari P, Adegoke SA, Mazzotti DR, Cançado RD, Nogutti MAE, Figueiredo MS. Interleukin-1 β and interleukin-6 gene polymorphisms are associated with manifestations of sickle cell anemia. *Blood Cell Mol Dis.* 2015;54(3):244–9.
51. Belisário AR, Mendes-Oliveira F, de Souza VR, Bolina-Santos E, Mendes FG, Moreno EC, et al. Association between inflammatory molecules, nitric oxide metabolites and leg ulcers in individuals with sickle cell anemia. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2022;44(2):169–76.
52. Rêgo MJB, da Silva RR, Pereira MC, da Silva Araújo A, da Rocha Pitta MG, Falcão DA, et al. Evaluation of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cell populations, IL-10 production, and their correlation with clinical and biochemical parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine.* 2015;75(2):310–5.
53. Ballas SK. Sickle cell anemia with few painful crises is characterized by decreased red cell deformability and increased number of dense cells. *Am J Hematol.* 1991;36(2):122–30.
54. Bowers AS, Duncan WW, Pepple DJ. Red blood cell deformability is reduced in homozygous sickle cell disease patients with leg ulcers. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016;5(2):199–204.
55. Connes P, Lamarre Y, Hardy-Dessources MD, Lemonne N, Waltz X, Mouguel D, et al. Decreased hematocrit-to-viscosity ratio and increased lactate dehydrogenase level in patients with sickle cell anemia and recurrent leg ulcers. *PLoS One.* 2013;8(11):e79680.
56. Akinsheye I, Alsaltan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin CT, Sebastiani P, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood.* 2011;118(1):19–27.
57. Hutz MH, Salzano FM, Adams J, Opitz JM. Hb F levels, longevity of homozygotes and clinical course of sickle cell anemia in Brazil. *Am J Med Genet.* 1983;14(4):669–76.
58. Adedeji MO, Ukoli FA. Haematological factors associated with leg ulcer in sickle cell disease. *Trop Geogr Med.* 1987;39(4):354–6.
59. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the multicenter study of hydroxyurea in sickle cell anemia. *N Engl J Med.* 1995;332(20):1317–22.
60. Dissemond J, Hoelt D, Knab J, Franckson T, Kröger K, Goos M. Leg ulcer in a patient associated with hydroxyurea therapy. *Int J Dermatol.* 2006;45(2):158–60.
61. Hwang SW, Hong SK, Kim SH, Seo JK, Lee D, Sung HS. A hydroxyurea-induced leg ulcer. *Ann Dermatol.* 2009;21(1):39–41.
62. Best PJ, Daoud MS, Pittelkow MR, Pettitt RM. Hydroxyurea-induced leg ulceration in 14 patients. *Ann Intern Med.* 1998;128(1):29–32.
63. Salmon-Ehr V, Leborgne G, Vilque JP, Potron G, Bernard P. Effets secondaires cutanés de l'hydroxyurée: étude prospective de 26 patients consultant dans un service de dermatologie. *Rev Med Interne.* 2000;21(1):30–4.
64. Soya E, Makowski C, Blaise S. Leg ulcer induced by hydroxycarbamide in sickle cell disease: what is the therapeutic impact? *Int Wound J.* 2019;16(4):897–902.
65. Tolu SS, Crouch A, Choi J, Gao Q, Reyes-Gil M, Ogu UO, et al. Hydroxyurea and fetal hemoglobin effect on leg ulcers in patients with sickle cell disease. *Ann Hematol.* 2022;101(3):541–8.
66. de Montalembert M, Voskaridou E, Oevermann L, Cannas G, Habibi A, Loko G, et al. Real-life experience with hydroxyurea in patients with sickle cell disease: results from the prospective ESCORT-HU cohort study. *Am J Hematol.* 2021;96(10):1223–31.
67. Alexander N, Higgs D, Dover G, Serjeant GR. Are there clinical phenotypes of homozygous sickle cell disease? *Br J Haematol.* 2004;126(4):606–11.
68. Serarslan G, Akgül F, Babayigit C. High prevalence of pulmonary hypertension in homozygous sickle cell patients with leg ulceration. *Clin Exp Hypertens.* 2009;31(1):44–8.
69. De Castro LM, Jonassaint JC, Graham FL, Ashley-Koch A, Telen MJ. Pulmonary hypertension associated with sickle cell disease: clinical and laboratory endpoints and disease outcomes. *Am J Hematol.* 2008;83(1):19–25.
70. Parent F, Bachir D, Inamo J, Lionnet F, Driss F, Loko G, et al. A hemodynamic study of pulmonary hypertension in sickle cell disease. *N Engl J Med.* 2011;365(1):44–53.
71. Nolan VG, Baldwin C, Ma Q, Wyszynski DF, Amirault Y, Farrell JJ, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in klotho with priapism in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2004;128:266–72.
72. Powars D, Chan LS, Schroeder WA. The variable expression of sickle cell disease is genetically determined. *Semin Hematol.* 1990;27(4):360–76.
73. Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB. The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol.* 1998;11(1):1–51.
74. Higgs DR, Aldridge BE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Hayes RJ, et al. The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. *N Engl J Med.* 1982;306(24):1441–6.
75. Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2005;129(4):465–81.
76. Ofosu MD, Castro O, Alarif L. Sickle cell leg ulcers are associated with HLA-B35 and Cw4. *Arch Dermatol.* 1987;123(4):482–4.
77. Salazar G, Colombo G, Lenna S, Antonioli R, Beretta L, Santaniello A, et al. HLA-B35 influences the apoptosis rate in human peripheral blood mononucleated cells and HLA-transfected cells. *Hum Immunol.* 2007;68(3):181–91.
78. Santaniello A, Salazar G, Lenna S, Antonioli R, Colombo G, Beretta L, et al. HLA-B35 upregulates the production of endothelin-1 in HLA-transfected cells: a possible pathogenetic role in pulmonary hypertension. *Tissue Antigens.* 2006;68(3):239–44.
79. Nebor D, Durpes MC, Mouguel D, Mukisi-Mukaza M, Elion J, Hardy-Dessources MD, et al. Association between Duffy antigen receptor for chemokines expression and levels of inflammation markers in sickle cell anemia patients. *Clin Immunol.* 2010;136(1):116–22.
80. Afenyi-Annan A, Kail M, Combs MR, Orringer EP, Ashley-Koch A, Telen MJ. Lack of Duffy antigen expression is associated with organ damage in patients with sickle cell disease. *Transfusion.* 2008;48(5):917–24.
81. Drasar ER, Menzel S, Fulford T, Thein SL. The effect of Duffy antigen receptor for chemokines on severity in sickle cell disease. *Haematologica.* 2013;98(8):e87–e89.
82. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843–54.
83. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(2):126–39.
84. Santos ED, Melo GI, Santana PV, Quadros IG, Yahouédéhou SC, Guarda CC, et al. A description of the hemolytic component in sickle leg ulcer: the role of circulating miR-199a-5p, miR-144, and miR-126. *Biomol Ther.* 2022;12(2):317.
85. Le NT, Abe JI. MicroRNA 199a and the eNOS (endothelial NO synthase)/NO pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(10):2278–80.
86. Li B, Zhu X, Ward CM, Starlard-Davenport A, Takezaki M, Berry A, et al. MIR-144-mediated NRF2 gene silencing inhibits fetal hemoglobin expression in sickle cell disease. *Exp Hematol.* 2019;70:85–96.
87. Zhang H, Li S, Zhou Q, Sun Q, Shen S, Zhou Y, et al. Qiliqiangxin attenuates phenylephrine-induced cardiac hypertrophy through downregulation of MiR-199a-5p. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(5):1743–51.
88. Hua Q, Jin M, Mi B, Xu F, Li T, Zhao L, et al. LINC01123, a c-Myc-activated long non-coding RNA, promotes proliferation and aerobic

- glycolysis of non-small cell lung cancer through miR-199a-5p/c-Myc axis. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):91.
89. Balasubramanian N, Devereaux M, Orlicky D, Sokol R, Suchy F. miR-199a-5p inhibits the expression of ABCB11 in obstructive cholestasis. *J Biol Chem*. 2021;297(6):101400. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34774795/>
 90. Kooshkaki O, Rezaei Z, Rahmati M, Vahedi P, Derakhshani A, Brunetti O, et al. MiR-144: a new possible therapeutic target and diagnostic/prognostic tool in cancers. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2578.
 91. Rodrigo-Muñoz JM, Gil-Martínez M, Lorente-Sorolla C, Garcia-Latorre R, Valverde-Monge M, Quirce S, et al. miR-144-3p is a biomarker related to severe corticosteroid-dependent asthma. *Front Immunol*. 2022;13:858722.
 92. Jansen F, Yang X, Hoelscher M, Cattelan A, Schmitz T, Proebsting S, et al. Endothelial microparticle-mediated transfer of microRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles. *Circulation*. 2013;128(18):2026–38.
 93. Ma Y, Liu H, Wang Y, Xuan J, Gao X, Ding H, et al. Roles of physical exercise-induced MiR-126 in cardiovascular health of type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr*. 2022;4(1):169.
 94. Leisegang MS, Schröder K, Brandes RP. Redox regulation and non-coding RNAs. *Antioxid Redox Signal*. 2018;29(9):793–812.
 95. Silva DG, Junior EB, de Souza Torres L, Júnior OR, de Castro Lobo C, Bonini-Domingos CR, et al. Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. *Blood Cell Mol Dis*. 2011;47(1):23–8.
 96. de Oliveira Filho RA, Silva GJ, de Farias Domingos I, Domingues Hatzlhofer BL, da Silva AA, de Lima Filho JL, et al. Association between the genetic polymorphisms of glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) and the clinical manifestations in sickle cell anemia. *Elsevier enhanced reader. Blood Cell Mol Dis*. 2013;51:76–9.
 97. Serjeant BE, Harris J, Thomas P, Serjeant GR. Propionyl-L-carnitine in chronic leg ulcers of homozygous sickle cell disease: a pilot study. *J Am Acad Dermatol*. 1997;37(3 Pt 1):491–3.
 98. Serjeant GR, Galloway RE, Gueri MC. Oral zinc sulphate in sickle-cell ulcers. *Lancet*. 1970;2(7679):891–2.
 99. Marti-Carvajal AJ, Knight-Madden JM, Martinez-Zapata MJ. Interventions for treating leg ulcers in people with sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021;1(1):CD008394.
 100. Miranda CT, Vermeulen-Serpa KM, Pedro AC, Brandão-Neto J, de Lima Vale SH, Figueiredo MS. Zinc in sickle cell disease: a narrative review. *J Trace Elem Med Biol*. 2022;72:126980.
 101. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science*. 2002;296(5573):1646–7.
 102. Pastar I, Khan AA, Stojadinovic O, Lebrun EA, Medina MC, Brem H, et al. Induction of specific MicroRNAs inhibits cutaneous wound healing. *J Biol Chem*. 2012;287(35):29324–35.
 103. Batista THC, Santana RM, Sobreira MJ, Arcanjo GS, Domingos IF, Pereira-Martins DA, et al. Up-regulation of miR-130a is related to leg ulcers in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2022;197(1):e16–e18.
 104. de Carvalho-Siqueira GQ, Ananina G, de Souza BB, Borges MG, Ito MT, da Silva-Costa SM, et al. Highlight article: whole-exome sequencing indicates FLG2 variant associated with leg ulcers in Brazilian sickle cell anemia patients. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2019;244(11):932–9.
 105. Senet P, Blas-Chatelain C, Levy P, Manea EM, Peschanski M, Mirault T, et al. Factors predictive of leg-ulcer healing in sickle cell disease: a multicentre, prospective cohort study. *Br J Dermatol*. 2017;177(1):206–11.
 106. Tan J, Smith A, Abisi S, Eastham D, Burnand KG. Tissue and urinary haemosiderin in chronic leg ulcers. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2007;34(3):355–60.
 107. Saad STO, Zago MA. Leg ulceration and abnormalities of calf blood flow in sickle-cell anemia. *Eur J Haematol*. 1991;46(3):188–90.
 108. Billet HH, Patel Y, Rivers SP. Venous insufficiency is not the cause of leg ulcers in sickle cell disease. *Am J Hematol*. 1991;37(2):133–4.
 109. Clare A, Fitz-Henley M, Harris J, Hambleton I, Serjeant GR. Chronic leg ulceration in homozygous sickle cell disease: the role of venous incompetence. *Br J Haematol*. 2002;119(2):567–71.
 110. Minniti CP, Kato GJ. Critical reviews: how we treat sickle cell patients with leg ulcers. *Am J Hematol*. 2016;91(1):22–30.
 111. Babalola OA, Ogunkeyede A, Odetunde AB, Fasola F, Oni AA, Babalola CP, et al. Haematological indices of sickle cell patients with chronic leg ulcers on compression therapy. *Afr J Lab Med*. 2020;9(1):8.
 112. MacFarlane DE, Baum KF, Serjeant GR. Bacteriology of sickle cell leg ulcers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986;80(4):553–6.
 113. Ademiluyi SA, Rotimi VO, Coker AO, Banjo TO, Akinyanju O. The anaerobic and aerobic bacterial flora of leg ulcers in patients with sickle-cell disease. *J Infect*. 1988;17(2):115–20.
 114. Sehgal SC, Arunkumar BK. Microbial flora and its significance in pathology of sickle cell disease leg ulcers. *Infection*. 1992;20(2):86–8.
 115. Byeon J, Blizinsky KD, Persaud A, Findley K, Lee JJ, Buscetta AJ, et al. Insights into the skin microbiome of sickle cell disease leg ulcers. *Wound Repair Regen*. 2021;29(5):801–9.
 116. Mohammedsaeed W, Cruickshank S, McBain AJ, O'Neill CA. *Lactobacillus rhamnosus* GG lysate increases Re-epithelialization of keratinocyte scratch assays by promoting migration. *Sci Rep*. 2015;5:16147.
 117. Nguyen VT, Nassar D, Batteux F, Raymond K, Tharaux PL, Aractingi S. Delayed healing of sickle cell ulcers is due to impaired angiogenesis and CXCL12 secretion in skin wounds. *J Invest Dermatol*. 2016;136(2):497–506.
 118. Meneses JVL, Fortuna V, de Souza ES, Daltro GC, Meyer R, Minniti CP, et al. Autologous stem cell-based therapy for sickle cell leg ulcer: a pilot study. *Br J Haematol*. 2016;175(5):949–55.
 119. Lemonne N, Charlot K, Waltz X, Ballas SK, Lamarre Y, Lee K, et al. Hydroxyurea treatment does not increase blood viscosity and improves red blood cell rheology in sickle cell anemia. *Haematologica*. 2015;100(10):e383–e386.
 120. Pule GD, Mowla S, Novitzky N, Wiysonge CS, Wonkam A. A systematic review of known mechanisms of hydroxyurea-induced fetal hemoglobin for treatment of sickle cell disease. *Expert Rev Hematol*. 2015;8(5):669–79.

How to cite this article: Catella J, Guillot N, Nader E, Skinner S, Poutrel S, Hot A, et al. Controversies in the pathophysiology of leg ulcers in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2024;205(1):61–70. <https://doi.org/10.1111/bjh.19584>

ORIGINAL PAPER

Haemoglobinopathies

Impaired microvascular function in patients with sickle cell anemia and leg ulcers improved with healing

Judith Catella^{1,2,3}   | Etienne Turpin^{2,3} | Philippe Connes^{2,3}  | Elie Nader^{2,3} | Romain Carin^{2,3} | Marie Martin^{2,3} | Hamdi Rezigue^{4,5}  | Christophe Nougier^{4,5} | Yesim Dargaud^{5,6} | Audrey Josset-Lamaugary⁷ | Justine Dugrain⁷ | Muriel Marano⁵ | Alexandre Leuci⁵ | Camille Boisson^{3,8} | Celine Renoux^{2,3,8}  | Philippe Joly^{2,3,8}  | Solène Poutrel^{1,2,3} | Arnaud Hot^{1,2,3} | Nicolas Guillot^{2,3} | Berengère Fromy⁷

¹Service de Médecine Interne et Vasculaire, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

²Laboratoire d'Excellence du Globule Rouge (Labex GR-Ex), Sorbonne, Paris, France

³Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (LIBM) EA7424, Equipe «Biologie Vasculaire et du Globule Rouge», Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France

⁴Service d'hématologie-hémostase, Hospices civils de Lyon, Bron, France

⁵EA 4609-Hémostase et cancer, UFR Laennec, Université Claude Bernard, Lyon 1, France

⁶Unité d'hémostase Clinique, Hôpital Cardiologique Louis Pradel, Lyon, France

⁷Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (LBTI UMR 5305), CNRS/Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

⁸Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Laboratoire de Biologie Médicale Multi-site, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Correspondence

Judith Catella, Service de Médecine Interne et Médecine Vasculaire, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon 69003, France.

Email: judith.catella@chu-lyon.fr

Funding information

Hospices Civils de Lyon

Summary

Leg Ulcer (LU) pathophysiology is still not well understood in sickle cell anaemia (SCA). We hypothesised that SCA patients with LU would be characterised by lower microvascular reactivity. The aim of the present study was to compare the microcirculatory function (transcutaneous oxygen pressure (TcPO₂) on the foot and laser Doppler flowmetry on the arm) and several blood biological parameters between nine SCA patients with active LU (LU+) and 56 SCA patients with no positive history of LU (LU-). We also tested the effects of plasma from LU+ and LU- patients on endothelial cell activation. We observed a reduction of the TcPO₂ in LU+ compared to LU- patients. In addition, LU+ patients exhibited lower cutaneous microvascular vasodilatory capacity in response to acetylcholine, current and local heating compared to LU- patients. Inflammation and endothelial cell activation in response to plasma did not differ between the two groups. Among the nine patients from the LU+ group, eight were followed and six achieved healing in 4.4 ± 2.5 months. Among thus achieving healing, microvascular vasodilatory capacity in response to acetylcholine, current and local heating and TcPO₂ improved after healing. In conclusion, microcirculatory function is impaired in patients with LU, and improves with healing.

KEYWORDS

endothelial cell, leg ulcers, microcirculation, sickle cell disease, transcutaneous oxygen pressure

Nicolas Guillot and Berengère Fromy contributed equally and co-last authors.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2024 The Author(s). *British Journal of Haematology* published by British Society for Haematology and John Wiley & Sons Ltd.

INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) is an autosomal recessive genetic disorder secondary to a single mutation in the β -globin gene. Sickle cell anaemia (SCA) is the most common and the most severe form of SCD, and is characterised by the presence of two β^S -globin alleles resulting in the production of an abnormal haemoglobin (Hb) called HbS.¹ HbS may polymerise under deoxygenated conditions,² leading to sickling and chronic haemolytic anaemia.³ The clinical expression of the disease is highly variable from one patient to another.⁴

Leg ulcer (LU) corresponds to spontaneous or traumatic wound, which failed to heal within 2 weeks. The prevalence of LU varied from 1.4% in Brazil to 29.5% in Jamaica.⁵⁻⁹ Usually located towards the ankle and very painful, sickle LU pathophysiology is still not well defined. It has been proposed that LU would be secondary to a local vaso-occlusion¹⁰ through several factors such as increased blood viscosity,¹¹ chronic haemolysis,⁴ increased oxidative stress,¹² increased inflammation,¹³ increased coagulation¹⁴ and decreased nitric oxide (NO) bioavailability¹⁵ promoting microvascular dysfunction. While compromised microvascular reactivity has been reported in SCD population,^{16,17} no study has compared patients with and without LU.

We hypothesised that SCA patients with LU would be characterised by lower microvascular reactivity than patients without LU. The first aim of the present study was to compare the cutaneous microvascular vasodilatory function assessed by laser Doppler flowmetry and transcutaneous oxygen pressure (TcPO₂) between SCA patients with active LU and those without LU (who never experienced LU). Using iontophoresis or heating, laser Doppler flowmetry assesses the ability of vessels to dilate in response to external stimuli and helps to characterise the signalling pathways and cell types involved in vasodilatation, such as NO, cyclooxygenase (COX) or neural mechanisms. In addition, TcPO₂ measures the amount of oxygen carried out by the cutaneous microcirculation and the oxygen consumed locally. The second aim of this study was to follow patients with active LU and compare their microcirculatory function before and after healing. Since it has been proposed that inflammation and haemolysis would be involved in LU occurrence in SCA,^{11,18} we suspected that the plasma from patients with LU would have more deleterious effects on endothelium than the plasma from patients without LU.

METHODS

The DrepanO₂ study was a single-centre, prospective and controlled study conducted in Lyon University Hospital between February 2022 and September 2023, and included 65 adults with SCA (HbSS or HbS β 0 genotypes) regularly followed by the Sickle Cell Centre at the Hospital Edouard

Herriot (Lyon, France). Patients belonged to the LU+ group if they had currently an active ulcer on the legs. Those who never experienced LU were included in the LU- group. Those without active LU but with a positive history of leg ulcers were not included.

Patients with acute episodes (infection, vaso-occlusive crisis (VOC), acute chest syndrome (ACS), stroke and priapism) in the past 4 weeks were excluded. At the time of the study, patients were undergoing systemic treatments (see Table 2); patients were included regardless of their disease-modifying treatment. A transfusion was not an exclusion criterion, but inclusion was carried out as far as possible from the previous transfusion.

Based on the microvascular response values obtained by our team in sickle cell patients with or without vaso-occlusive complications,^{17,19,20} and the prevalence of leg ulcers in sickle cell patients, a minimum of six subjects per group (i.e. with and without LU) would be necessary (with an alpha risk of 0.05 and a power of 90%, two-sided test). We observed that approximately 10% of the sickle cell population in Lyon is affected by leg ulcers. As the number of patients included should reflect this proportion, we decided to include a total of 70 patients (with a minimum of seven in the group of sickle cell patients with ulcers).

All patients were informed and gave their written informed consent. The study was conducted in accordance with the guidelines set by the Declaration of Helsinki and was approved by the Regional Ethics Committee (CPP Sud-Est IV, Lyon, France, registration number: 2021-A01605-36).

Follow-up

Patients with active LU+ were scheduled for a second visit at 6 months, or earlier if the ulcer healed before that time. According to the healing status at the second visit, patients were divided into 'LU+ healed' or 'LU+ still active'.

General parameters

Data concerning medical history were collected: sickle cell genotype, age at first LU, α -thalassaemia status, clinical phenotype of SCA, cardiovascular risk factors (tobacco status, diabetes, treated hypertension and diabetes mellitus) and previous history of venous thrombo-embolism. Body mass index was calculated ($\text{BMI} = \text{weight}/\text{height}^2$ (Kg/m^2)) for all patients. Charts were retrospectively reviewed by one physician to record all ACS and VOC episodes, within the 2 previous years. Treatments were classified as specific for hydroxyurea, pyruvate kinase activator and Voxelator and non-specific for the other treatments. Analgesics were classified as level 1 (paracetamol), level 2 (tramadol, codeine, nefopam chlorhydrate) and level 3 for opioids.

LU area was measured (based on greatest width and length) and presence of leg oedema was assessed. Need of

technical assistance for mobilisation was reported as it can influence venous return.

Venous blood was taken from the antecubital vein and collected into citrate, EDTA, heparin and dry tubes for whole blood and plasma analysis.

Routine biology, biochemistry and coagulation

Several routine biological and biochemical parameters were determined.

Citrate blood was used for D-Dimers, prothrombin time, activated partial thromboplastin time (APTT) ratio, fibrinogen, chromogenic protein C activity (%) and protein S free antigen level.

Pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases

Concentration of Interleukin-1 alpha (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, tumour necrosis factor-alpha (TNF- α), vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), MMP-3, MMP-8, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) were assessed in plasma from LU- and LU+ SCA patients. Quantification was performed based on the Luminescence xMAP technology, using the Human ProcartaPlex Mix and Match Panel (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. Plates were analysed on a Bio Plex 200 analyser (AniRA, Lyon, France).

Assessment of skin sensory function

Since neurovascular interactions are impaired by neuropathic disorders, all patients and controls underwent a sensory assessment based on the examination of cutaneous modalities (thermal sensitivity, tactile and vibration) on upper and lower limbs.²¹ Thermal sensitivity was analysed in response to hot (around 45°C) and cold (around 4°C) stimulation applied to the skin. A set of 20 Von Frey monofilaments was used, decreasing force from 300 g to 0.008 g, to assess cutaneous tactile threshold.²² Vibration sensitivity was assessed on trapeze and distal extremity of radius for upper limbs and on distal extremity of tibia and on the base of the first metatarsus for lower limbs. Irrespective of the leg ulcer status, all other tests were performed on the internal face of forearms for upper limbs and around the ankle and on the feet for lower limbs. For each individual, three determinations were carried out.

Vascular evaluation

Systolic and diastolic blood pressures (BP) were measured as recommended²³ before and after microvascular evaluation.

BP values of 120/70 mmHg were considered as normal. Patients with BP values >120/70 mmHg at the two measures were considered as having hypertension.^{24,25}

Ankle pressure and/or toe systolic pressure were measured according to standard operating protocols, on the leg with the ulcer when applicable. Patients with Ankle brachial index <0.90 or Toe brachial index <0.70 were considered to have peripheral artery disease.²⁶ T_{tcp}O₂ measurements were performed using TCM 400 Monitor (Radometer, Neuilly-Plaisance, France) set to default temperature at 43°C.²⁷ The measurements were taken while the patient was lying down, after removing compression. Probes were placed at the first intermetatarsal space. T_{tcp}O₂ values were collected after 20 min of recording and after stabilisation.

Cutaneous microvascular function was analysed by laser Doppler flowmetry (Laser Doppler PF5010, Perimed) on the volar aspect of forearms for all patients and controls in supine position.²⁸ To assess endothelium-mediated vasodilatation, cutaneous blood flow was measured in response to anodal iontophoretic delivery (100 μ A, 20 s) of acetylcholine (Ach, 2%) and to cathodal current application (100 μ A, 60 s) of deionised water. Local heating to 42°C was also performed with the laser Doppler probe at a third site of the forearm. A stable baseline blood flow was first recorded for a few minutes before the iontophoretic current, or heat was applied. Modifications of cutaneous blood flow were continuously recorded for 30 min by the laser Doppler on each of the three sites, measuring the effect of the stimuli on skin microcirculation in real time.

Cell culture

Human Dermal Microvascular Endothelial Cell (HDMEC) were purchased from PromoCell (#C-12262). HDMEC were cultured in Endothelial Cell Growth Medium MV2 (PromoCell, #C-39221) at 37°C and 5% CO₂. The culture cells were maintained until passage 5 according to the manufacturer's protocol. For experiments, HDMEC were treated with culture medium containing 5% plasma from LU- or LU+ patients.

Total RNA/DNA isolation and qPCR

RNA was analysed on HDMEC incubated with plasma of LU- and LU+ patients. Total RNA from HDMEC was isolated using a chloroform/phenol procedure (TRIzol Reagent, Thermo Fisher Scientific, #15596018). mRNAs were reverse-transcribed into cDNA using PrimeScript RT Reagent kit (Takara Bio Europe, #RR037A) and primers specific to genes of interest (Data S1), and analysed in real-time qPCR using TB Green Premix ExTaq (Takara Bio Europe, #RR42WR). Results were normalised to TATA-box binding protein (TBP) housekeeping gene as previously published.²⁹

Western blotting

Western blot was performed on HDMEC incubated with the plasma of LU- and LU+ patients. Total proteins from HDMEC were extracted using RIPA buffer (Cell Signaling #9806S) containing protease and phosphatase inhibitors cocktail (Thermo Fisher Scientific, #A32955). After quantification with the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, #23227), 20 µg of proteins was loaded on a 4–20% Precast Protein Gel (Bio Rad, #4561095) and transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio Rad, #1704272) by a semi-dry transfer. The membrane was incubated for 1 h at room temperature (RT) in blocking buffer (TBS-Tween-20 0.1%, 5% BSA) and immunoblotted overnight at 4°C with primary antibodies targeting eNOS, phospho-eNOS (Ser1177), ERK and phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (Data S2). After washing, HRP-linked secondary antibodies (Data S2) were applied on the membrane for 1 h at RT. Membrane was revealed using Chemiluminescent Substrate (Bio Rad, #1705060) and the signal was detected by the ChemIDoc (LYOS, Lyon, France).

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard deviation or *n* (%). Comparisons between LU- and LU+ SCA patients were achieved by using independent Student's *t*-test and Mann-Whitney *U*-test, when appropriate, using Prism software (version 10.1.1, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Paired *t*-tests were used to compare microcirculatory function before and after healing in the LU+ healed patients. A *p* value <0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

Characterisation of LU and characteristics of patients with and without LU

Sixty-five patients were enrolled at the time of the analysis. Five patients had HbSβ0 genotype in the LU- group, while all other patients had HbSS genotype (Table 1). Nine patients composed the LU+ group (Figure 1), of whom seven patients had one active LU, one patient had two active LUs and one patient had three active LUs. Mean age at first ulcer was 35.5 ± 18.8 years old. The mean area of LU was 10.3 ± 10.1 cm². There were no significant predominant side (4LU on the right side and 8LU on the left side) nor predominant malleoli (eight on the external malleoli and four on the internal malleoli). The mean LU duration was 8.3 ± 7.5 months. The LU+ group was older than the LU- group (*p* < 0.0001; Table 1). There was no difference in sex ratio between the two groups. LU- group had more frequent VOCs than LU+ group during the last 2 years (*p* 0.002; Table 1). There was no other significant association between the occurrence of sickle LU and other complications of SCA (i.e. acute chest syndrome, pulmonary hypertension, ischaemic stroke,

TABLE 1 Comparison of clinical phenotypes between SCA patients with (LU+) and without (LU-) leg ulcer.

	LU+	LU-
	<i>n</i> = 9	<i>n</i> = 56
HbSS genotype	9 (100)	51 (91.1)
Age (years)	48.5 ± 9.2	31.8 ± 10.7***
α-thalassaemia	4 (50.0)/8	23 (41.1)/50
Male	4 (44.0)	22 (39.3)
Body mass index (kg/m ²)	23.6 ± 3.4	21.8 ± 3.6
SCD complications		
VOCs last 2 years	0.6 ± 0.7	1.9 ± 2.3**
ACSs last 2 years	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.7
History of ACS	6 (66.7)	33 (58.9)
Pulmonary hypertension	0	0
Ischaemic stroke	1 (11.1)	1 (1.8)
Priapism	1 (25.0)	4 (18.2)
Osteonecrosis	4 (44.0)	15 (26.8)
Retinopathy	0	5 (8.9)
Respiratory insufficiency		
Medical history	0	2 (3.6)
Current smoker	1 (11.1)	10 (17.9)
Dyslipidaemia	1 (11.1)	1 (1.8)
Treated hypertension	0	4 (7.1)
Mellitus diabetes	0	0
Venous thromboembolism	6 (66.7)	7 (12.5)**
Measured hypertension	3 (33.3)	7 (12.7)
Peripheral arterial disease	1 (11.1)	0
Technical assistance for mobilisation	2 (22.2)	1 (1.8)*
Leg oedema	8 (88.9)	4 (7.3)***

Note: Values represent mean ± standard deviation or *n* (%). Significant difference: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001.

Abbreviations: ACS, acute chest syndrome; LU, leg ulcers; VOC, vaso occlusive crisis.

priapism, osteonecrosis and retinopathy). Venous thromboembolisms were more frequent in the LU+ group compared to the LU- group (*p* 0.001; Table 1). Leg oedema and need of technical assistance for mobilisation were more frequent in the LU+ group than in the LU- group (*p* < 0.0001 and *p* 0.048 respectively) (Table 1). Recent RBC transfusion was more frequent in the LU+ group compared to the LU- group (*p* 0.005; Table 2). The mean time from study day to last transfusion was 82 ± 25 days for the 3LU- transfused patients in the past 4 months and 48 ± 22 days for the 4LU+ transfused patients in the last 4 months. All patients were treated with hydroxyurea except two patients with Voxelator in the LU+ group and one patient without any treatment in the LU- group. The mean dose of hydroxyurea per week was significantly higher in the LU- group. There was no significant difference in the non-specific treatment except more analgesic level 3 (opioids) and compression therapy

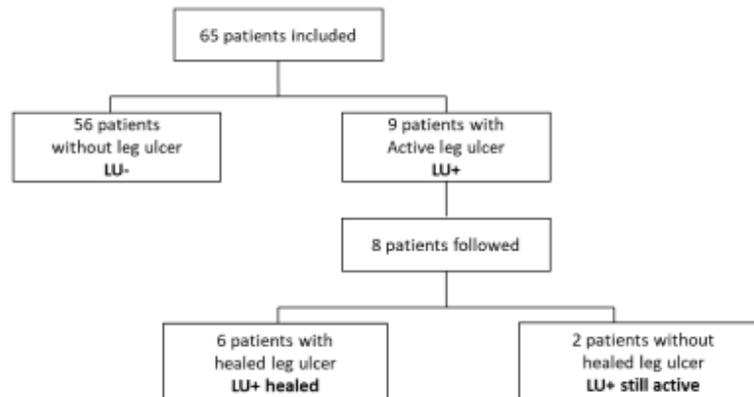


FIGURE 1 Flow chart.

TABLE 2 Comparison of treatment between SCA patients with (LU+) and without (LU-) leg ulcer.

	LU+ n=9	LU- n=56
No transfusion < 4 months	5 (55.6)	53 (94.6)**
Disease modifying treatment		
Hydroxyurea	6 (66.7)	53 (94.6)*
Hydroxyurea + pyruvate kinase activator	0	1 (1.8)
Hydroxyurea + voxelotor	1 (11.1)	2 (3.6)
Voxelotor	2 (22.2)	0*
None	0	1 (1.8)
Mean hydroxyurea dose per week \pm SD (mg)	6028 \pm 2917	8508 \pm 2696*
Other treatments		
Iron chelator	2 (22.2)	2 (3.6)
Analgesic		
None	3 (33.3)	35 (63.6)
Level 1	2 (22.2)	12 (21.8)
Level 2	2 (22.2)	8 (14.5)
Level 3	2 (22.2)	0*
Antiplatelet therapy	1 (11.1)	2 (3.6)
Anticoagulant treatment	3 (33.3)	7 (12.5)
Statin	1 (11.1)	1 (1.8)
RAAS blocker	2 (22.2)	5 (8.9)
Oxygen therapy	2 (22.2)	2 (3.6)
Leg compression therapy	8 (88.9)	4 (7.3)***

Note: Values represent n (%). Analgesics were classified in level 1 (paracetamol), level 2 (tramadol, codeine, nefopam chlorhydrate) and level 3 for opioids. Significant difference: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Abbreviations: LU, leg ulcer; RAAS, renin angiotensin aldosterone system.

in the LU+ group compared to the LU- group ($p = 0.017$ and $p < 0.0001$ respectively). No difference in anticoagulant therapy was observed between the two groups.

TABLE 3 Comparison of peripheral sensory parameters between SCA patients with (LU+) and without (LU-) leg ulcer.

	LU+ n=9	LU- n=55
Pain analogue visual scale (except ulcer)	5.1 \pm 4.1	1.3 \pm 2.3*
Intermetatarsal TcPO ₂ (mmHg)	53.0 \pm 10.0	67.5 \pm 13.5***
Abnormal warm sensitivity		
Upper limb	0	0
Lower limb	2 (22.2)	1 (1.8)*
Abnormal cold sensitivity		
Upper limb	0	0
Lower limb	3 (33.3)	1 (1.8)**
Abnormal pinprick test		
Upper limb	0	1 (1.8)
Lower limb	1 (11.1)	1 (1.8)
Abnormal vibration test		
Upper limb	0	0
Lower limb	1 (11.1)	2 (3.6)
Von Frey		
Upper limb	0.02 \pm 0.02	0.008 \pm 0.002
Lower limb	1.0 \pm 2.8	0.11 \pm 0.54

Note: Values represent mean \pm standard deviation or n (%). One LU- patient did not perform a physical examination due to lack of time by the patient. Significant difference: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Abbreviations: LU, leg ulcer.

Patients from the LU+ group had lower oxygen pressure and impaired sensitivity

The TcPO₂ in the LU+ group was lower than in the LU- group ($p < 0.001$, Table 3). There was no difference regarding pinprick, vibration and Von Frey tests between the two groups at lower and upper limbs. Sensitivity response to warm and cold on the lower limb was more impaired in LU+ compared

to LU- patients ($p=0.0048$ and 0.007 , respectively, Table 3) but no difference was observed on upper limb between the two groups.

Patients from the LU+ group had decreased albumin concentration, and inflammation level was not different between the two groups

LU+ group had higher haemoglobin, neutrophils and fibrinogen levels than LU- group (p 0.035, 0.041 and 0.042 respectively) (Table 4). Albumin was lower in the LU+ group ($p < 0.001$; Table 4). Exclusion of patients who have received RBC transfusion in the preceding 4 months (four in LU+ group and three in LU- group) did not modify the biological results, except for neutrophils (see Table S1).

Cytokines (TNF- α , IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15), VEGF-A, metalloproteinases (MMP-1, MMP-3 and MMP-9) and TIMP-1 levels did not differ between the two groups (Figure S1). MMP-8 values were under the threshold of detection.

Patients from the LU+ group had lower microvascular reactivity in response to various stimuli

Using Laser Doppler flowmetry, microvascular experiments showed no difference regarding basal skin blood flow between LU+ and LU- groups (Figure 2A). In contrast, the cutaneous vasodilatation in response to acetylcholine, current and local heating was reduced in the LU+ group compared to LU- group ($p < 0.001$ for all) (Figure 2A). We did not find any significant negative correlation between age and the different markers of microcirculatory function in SCD patients (data not shown).

Effect of plasma from patients on endothelial cells cultures

Endothelial cells incubated with the plasma of patients from the LU+ group show no significant difference regarding mRNA expression of eNOS, COX-1, COX-2, VCAM-1 and E-selectin compared to endothelial cells incubated with the plasma of the LU- group (Figure 3). Using western blot, we found no significant difference regarding P-eNOS/eNOS and P-ERK/ERK ratios between the two groups (Figure 3).

Follow-up

Among the nine patients with active LU, eight patients were followed (Figure 1). The mean time until second visit was 8.6 ± 4.7 months. Some visits had to be delayed due to intercurrent vaso-occlusive crises, to achieve a steady state.

TABLE 4 Comparison of biological parameters between SCA patients with (LU+) and without (LU-) leg ulcer.

	LU+ n=9	LU- n=56
Haematology		
Haemoglobin (g/dL)	10.4 \pm 1.0	9.3 \pm 1.5*
MCV (fl)	96.7 \pm 17.7	91.4 \pm 16.2
MCHC (g/100 mL)	340 \pm 3.5	347 \pm 13
White blood cells (G/L)	9.0 \pm 2.6	7.1 \pm 2.8
Neutrophils (G/L)	5.8 \pm 2.4	4.1 \pm 2.3*
Eosinophils (G/L)	0.15 \pm 0.12	0.16 \pm 0.16
Basophils (G/L)	0.04 \pm 0.02	0.08 \pm 0.12
Monocytes (G/L)	0.99 \pm 0.39	0.70 \pm 0.59
Lymphocytes (G/L)	2.0 \pm 0.82	2.3 \pm 0.86
Platelets (G/L)	388 \pm 164	381 \pm 245
Reticulocytes (G/L)	165 \pm 39	163 \pm 47
Reticulocytes (%)	7.6 \pm 4.2	8.0 \pm 4.9
Coagulation		
D Dimers (ng/L)	1437 \pm 740	2152 \pm 1406
Prothrombin time (sec)	14.4 \pm 5.0	15.6 \pm 15.0
APTT ratio	1.06 \pm 0.17	0.97 \pm 0.13
Fibrinogen (g/L)	3.8 \pm 1.2	3.1 \pm 0.97*
Protein C activity (%)	90.4 \pm 13.9	84.5 \pm 14.7
Protein S free antigen (%)	67.2 \pm 29.5	71.6 \pm 19.6
Biochemistry		
Creatinine (μ mol/L)	54.8 \pm 26.8	54.9 \pm 12.2
Albumin (g/L)	38.7 \pm 4.0	44.0 \pm 4.0***
Prealbumin (g/L)	0.19 \pm 0.04	0.22 \pm 0.05
LDH (UI/L)	442 \pm 94	451 \pm 134
ASAT (UI/L)	68.3 \pm 40.3	47.7 \pm 21.9
Total bilirubin (μ mol/L)	47.9 \pm 32.4	36.7 \pm 18.8
Haptoglobin (g/L)	0.09 \pm 0.14	0.08 \pm 0.23
Ferritin (ng/mL)	354 \pm 420	291 \pm 300
C reactive protein (mg/L)	12.1 \pm 14.5	10.1 \pm 26.2

Note: Values represent mean \pm standard deviation. Significant difference: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Abbreviations: aPTT, activated partial thromboplastin time; ASAT, aspartate aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; LU, leg ulcer; MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume.

Six patients were healed at second visit (LU+ healed) with a mean delay of healing of 4.4 ± 2.5 months. The remaining two patients (LU+ still active) experienced a reduction in the size of their ulcers: one patient exhibited a decrease from 6.3 cm^2 to 3.1 cm^2 , while the other patient had three ulcers, with their sizes decreasing from 21.2 cm^2 to 7.9 cm^2 for ulcer 1, 27.5 cm^2 to 16.5 cm^2 for ulcer 2, and 25.5 cm^2 to 5.5 cm^2 for ulcer 3.

The mean ulcer size at the initial visit was $5.7 \pm 4.8 \text{ cm}^2$ for the patients who achieved healing and $20.7 \pm 9.6 \text{ cm}^2$ for those who did not heal. The mean duration since ulcer occurrence at the initial visit was 4.6 ± 4.8 months for patients who achieved healing, and 15.0 ± 6.0 months for the other two

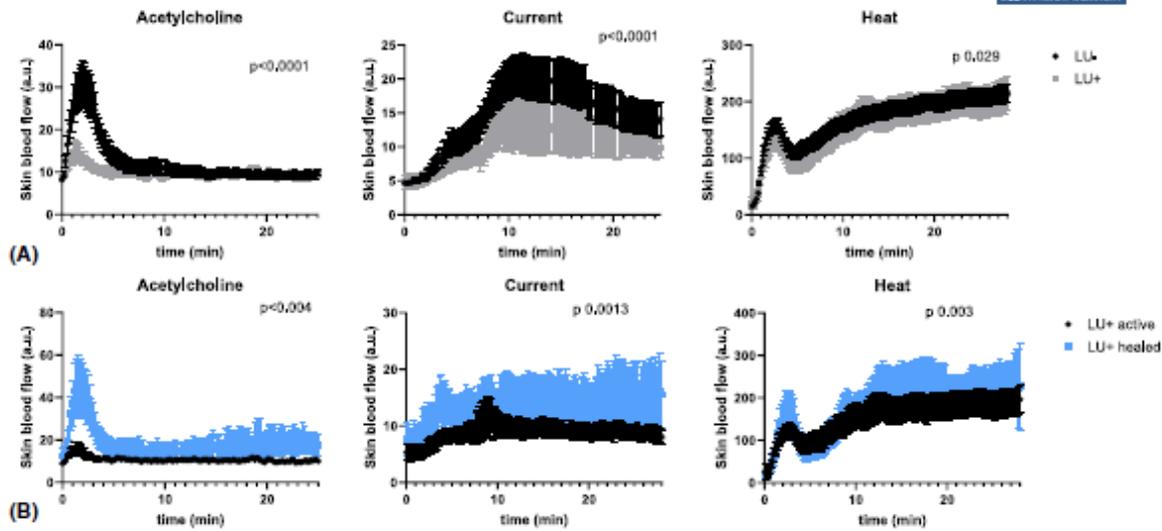


FIGURE 2 Skin blood flow in SCA patients in responses to various stimuli. (A) Patients with leg ulcer (LU+, grey) or without leg ulcer (LU-, black) in response to acetylcholine ($n=9$ LU+ and 56 LU-), current ($n=9$ LU+ and 56 LU-) and local heating (42°C) ($n=9$ LU+ and 53 LU-). All responses were significantly different between LU+ and LU- (Mann-Whitney U -test). (B) Six patients with active LU at initial visit (black, $n=6$) and after healing (blue, $n=6$) in response to acetylcholine, current and local heating. All responses were significantly different after healing (Wilcoxon matched pairs test).

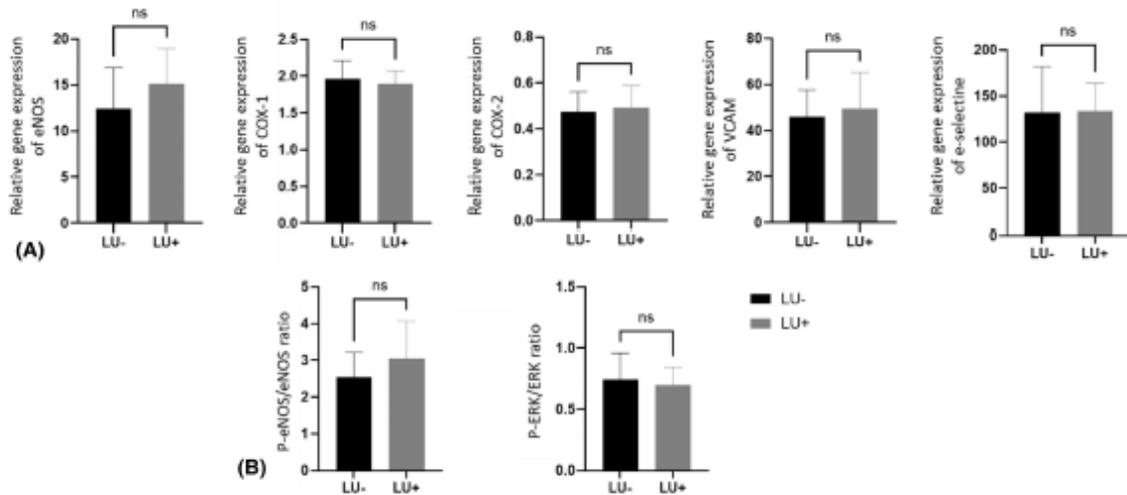


FIGURE 3 (A) mRNA expression on endothelial cells (HDMEC) incubated with plasma of 10 patients without leg ulcer (LU-) and eight patients with leg ulcer (LU+) determined by quantitative PCR. Expression is reported to TATA-box binding protein. Significant difference: * $p < 0.05$; NS: No significant difference. (B) Phosphorylated NOS/eNOS ratio and phosphorylated ERK/ERK ratio determined on endothelial cells (HDMEC) incubated with the plasma of 11 patients without leg ulcer (LU-) and eight patients with leg ulcer (LU+) by western blot. Significant difference: * $p < 0.05$; NS: No significant difference.

patients. Among the two patients who did not reach healing, only Voxelator was administered. The remaining patients were treated solely with Hydroxyurea except one patient receiving a combination of Hydroxyurea and Voxelator. The mean TcPO_2 at first intermetatarsal space was 57 ± 7 mmHg for the six patients who achieved healing and 42 ± 9 mmHg for the two other patients.

For the six patients who achieved healing, we compared microcirculatory function between the initial visit and the second visit (after ulcer healing). Mean TcPO_2 at first intermetatarsal spaces was significantly higher after healing (64 ± 7 mmHg and 74 ± 4 mmHg, $p = 0.037$). There was no difference regarding routine biology and biochemistry between the two times of measurement (see Table S2). The cutaneous

vasodilatation in response to acetylcholine, current and local heating was higher after healing than before (p 0.004, p 0.0013 and p 0.003 respectively) (Figure 2B).

DISCUSSION

The present study showed that (1) SCA patients with active LU had a reduction of their cutaneous microvascular vasodilatory capacity compared to patients who never experienced LU; (2) leg ulcer healing was accompanied by an improvement of the cutaneous microvascular vasodilatory capacity.

The patients with LU included in this study are similar to those typically described in the literature, in that they frequently had oedema,³⁰ ulcer-related ankylosis that required more often technical assistance for mobility, and less frequent VOCs.³¹ Surprisingly, patients with LU had a higher haemoglobin level (even after excluding transfused patients) compared to those without, which could be explained by the fact that all patients (except one) were treated with disease-modifying therapy (mostly hydroxyurea), which reduces haemolysis.³² Previous studies demonstrated a connection between LU and reduced albumin levels in SCA,³³ like in ulcers in non-SCA population.³⁴ Nevertheless, in our study, the albumin levels in the LU+ group remained within the normal range,³⁵ and it is unclear whether the lower albumin levels preceded the occurrence of LU or if they emerged during the attempt at wound healing. It could be interesting to propose nutritional supplementations for SCA patients with LU and low albumin levels to test the impact on LU healing. Besides, we found no difference regarding body weight and body mass index between the two groups, which confirms previous works.^{7,33}

Some of the differences in baseline laboratory parameters (haemoglobin, neutrophil count and albumin) could be the result of chronic inflammation associated with leg ulcers. Despite higher levels of neutrophils and fibrinogen in the LU+ group, we found no difference in inflammatory cytokines between the LU+ and LU- groups. The majority of the patients of the LU+ group underwent compression therapy, which is considered a cornerstone in sickle LU treatment.³⁰ However, as compression therapy improves venous shear stress, it has been shown to decrease plasma inflammatory cytokines,³⁶ which might explain the lack of major difference in inflammation between the two groups. Incubation of endothelial cells with the plasma of LU+ and LU- patients did not show any difference in endothelial activation.

Interestingly, the inter metatarsal TcPO₂ was lower in the LU+ group compared to LU- patients, in the absence of peripheral arterial disease except in one patient of the LU+ group. The mean TcPO₂ reported in the LU- group was close to the known normal value while LU+ group had values 20% lower.³⁷ Leg oedema would not be responsible for this TcPO₂ defect, since a previous study showed that removal of oedema did not modify TcPO₂ values.³⁸ We suggest that TcPO₂ defect in LU+ patients could be due to

a microvascular insufficiency, which could contribute to peripheral neuropathy. The sensory defect observed with cold and heat stress on the lower limbs and with the Von Frey test on the four limbs in the LU+ patients compared to LU- patients strengthens this hypothesis. We also observed a statistically significant impairment of the microvascular capacity of vasodilatation in response to stimuli. It is largely admitted from human studies that local delivery of acetylcholine in the skin induces endothelium-dependent vasodilatation mediated by cyclooxygenase (COX) and NO pathways.³⁹ Current-induced vasodilatation primarily results from a stimulation of the COX-1 pathway.⁴⁰ Local heating is known to cause a two-phase vasodilatory response: an initial peak that mostly depends on the stimulation of afferent sensory nerve fibres and a second plateau response, which mainly depend on the production of NO by endothelial cells.^{28,41,42} In our study, the functional exploration of the skin microcirculation in response to acetylcholine, current and heat clearly showed a decreased microvascular reactivity in the LU+ group compared to the LU- group. The lower peak response to acetylcholine and current suggests an impairment in the COX pathway,³⁹ while the lower plateau response to heat suggests an impairment of the NO pathway.²⁸ We were unable to demonstrate a difference between the two groups in the endothelial mRNA expression of eNOS and COX, or in the endothelial P-eNOS/eNOS ratio, after incubation of endothelial cells with plasma. Further studies are needed to understand why microvasodilatory capacity was lower in SCA patients with LU compared to those without.

Although the number of patients with active LU was small in the present study, we were able to follow them for several months and to perform new measurements of their microcirculatory function. We observed healing in six of the eight patients followed. Healing was well predictable by the criteria of healing prognosis of sickle LU observed in the French cohort reported by Senet et al.⁴³; patients achieving healing had a smaller total LU area (i.e. <8 cm²) and a shorter LU duration (i.e. <9 weeks) compared to those who did not heal.⁴³ We observed that healing was associated with improved TcPO₂ value on first intermetatarsal spaces and improved microvascular vasodilatation. This result is consistent with the old hypothesis that TcPO₂ reflects the oxygen delivered by vessels minus the oxygen locally consumed by wound.⁴⁴ However, the results reported in this study raise the question of an improvement in TcPO₂ that could be due to the increased microcirculatory vasodilatory capacity after healing. We ignore if healing was facilitated by the microcirculatory improvement or if the microcirculatory improvement was secondary to healing. The number of patients who did not achieve healing was too low ($N=2$) to compare to those who did achieve healing. To our knowledge, there is no previous study comparing the microcirculatory vasodilatory capacity by iontophoresis before and after healing, both in SCA and non-SCA population.

Our study has some limitations. The main limitation is the small sample size of LU+ group, due to a low incidence of leg ulcers in SCD patients in our centre. Moreover,

differences in baseline characteristics between the LU+ and LU- groups introduced confounding factors into the interpretation of the results. These differences included a higher age in the LU+ group and a higher proportion of osteonecrosis in the LU- group. Older sickle cell patients without ulcers were less likely to participate due to several reasons such as lack of time, lack of interest in the financial compensation and fatigue from frequent blood draws. We were therefore unable to obtain age-matched groups.

Ageing impacts on the vascular system in the general population^{21,45,46} and one could suspect an effect of age in the loss of vasodilatory capacity of the microcirculation in the LU+ group. Nevertheless, we did not find any correlation between age and the different markers of the microcirculatory function in the present study. The loss of the vasodilatory capacity of the microcirculation in SCD is already present at early age⁴⁷ and although age surely contributes to the progression of vasculopathy, it is probably difficult to isolate the influence of age in the context of SCD, as chronic haemolysis, inflammation and oxidative stress play a significant role in the deterioration of the vascular function.

We also observed a higher rate of VTE in patients with ulcers. We are unsure if VTEs affect microcirculatory reactivity, but all episodes occurred more than 3 months prior to inclusion. Conversely, the higher proportion of leg oedema in LU+ patients could have contributed to impaired microvascular reactivity by increasing shear stress locally, leading to endothelial cell activation.⁴⁸ There was also an imbalance in the use of hydroxyurea, which was higher in the LU- patients and might affect endothelial activation. It has been shown that cutaneous microvascular dilation is greater in SCD patients treated with hydroxyurea than in those who do not receive this treatment.⁴⁹ It could therefore be possible that hydroxyurea minimised the difference in microvascular reactivity between the two groups.

Our study does not allow us to determine whether microcirculatory defects are a cause or a consequence of leg ulcers. It would be necessary to study patients just before the onset of leg ulcers and after ulcers appear. The timing of leg ulcer development is unpredictable and it is not possible to identify in advance which patients will develop ulcers, it is therefore not possible to conduct such a study at the present time.

In conclusion, our study demonstrated that patients with active LU had poor microcirculatory function and that those who healed improved vasodilatory capacity of the microcirculation. The impaired microcirculation could limit oxygen delivery to cutaneous tissues, increasing the risk for LU to occur or limiting LU healing process. Although laser Doppler flowmetry experiments suggest an involvement of the COX and NO pathways in the alterations of the microcirculatory capacity of the patients with LU, further studies are needed to address the exact mechanisms of LU which could improve clinical management of this complication.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge the contribution of patients to realise this study.

FUNDING INFORMATION

This research was granted by Hospices Civils de Lyon (Appel d'Offre Jeune Chercheur 2021).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

All authors have no conflict of interest to disclose.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, JC, upon reasonable request.

INFORMED CONSENT

Complete written informed consent was obtained from the patient.

CLINICAL TRIAL REGISTRATION

ClinicalTrials.gov ID NCT04983654.

ORCID

Judith Catella  <https://orcid.org/0000-0001-8028-6827>
 Hamdi Rezigue  <https://orcid.org/0009-0003-3765-3603>
 Celine Renoux  <https://orcid.org/0000-0002-7263-805X>
 Philippe Joly  <https://orcid.org/0000-0002-2351-9441>

TWITTER

Judith Catella  JudithCatella
 Philippe Connes  connesphilippe

REFERENCES

- Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2010;376(9757):2018–31.
- Pauling L, Itano HA. Sickle cell anemia a molecular disease. *Science*. 1949;110(2865):543–8.
- Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):1–22.
- Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*. 2007;21(1):37–47.
- Cumming V, King L, Fraser R, Serjeant G, Reid M. Venous incompetence, poverty and lactate dehydrogenase in Jamaica are important predictors of leg ulceration in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2008;142(1):119–25.
- Olatunya OS, Albuquerque DM, Adekile AD, Costa FF. Evaluation of sociodemographic, clinical, and laboratory markers of sickle leg ulcers among young Nigerians at a tertiary health institution. *Niger J Clin Pract*. 2018;21(7):882–7.
- Antwi-Boastako C, Andemariam B, Colombatti R, Asare EV, Strunk C, Piccone CM, et al. A study of the geographic distribution and associated risk factors of leg ulcers within an international cohort of sickle cell disease patients: the CASiRe group analysis. *Ann Hematol*. 2020;99(9):2073–9.
- Sprua JAO, Borges EL, Guedes ACM, Andrade PGR, de Lima VL. Prevalence of people with sickle cell disease and leg ulcers in Brazil: socioeconomic and clinical overview. *PLoS One*. 2022;17(9):e0274254.
- Madu A, Madu K, Anigbogu I, Ugwu AO, Okwulehe VA, Ololo U, et al. Phenotypic characterisation and associations of leg ulcers in adult sickle cell patients. *Wound Repair Regen*. 2022;30(1):126–31.
- Catella J, Guillot N, Nader E, Skinner S, Poutrel S, Hot A, et al. Controversies in the pathophysiology of leg ulcers in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2024;205:61–70.

11. Connes P, Lamarre Y, Hardy-Dessources MD, Lemonne N, Waltz X, Mougenel D, et al. Decreased hematocrit-to-viscosity ratio and increased lactate dehydrogenase level in patients with sickle cell anemia and recurrent leg ulcers. *PLoS One*. 2013;8(11):e79680.
12. Silva DG, Junior EB, de Souza Torres L, Júnior OR, de Castro Lobo C, Bontint-Domingos CR, et al. Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. *Blood Cell Mol Dis*. 2011;47(1):23–8.
13. Belisário AR, Mendes-Oliveira F, de Souza VR, Bolina-Santos E, Mendes FG, Moreno EC, et al. Association between inflammatory molecules, nitric oxide metabolites and leg ulcers in individuals with sickle cell anemia. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2022;44(2):169–76.
14. Ataga KI, Orringer EP. Hypercoagulability in sickle cell disease: a curious paradox. *Am J Med*. 2003;115(9):721–8.
15. Landburg PP, Teerlink T, Blemond BJ, Brandjes DPM, Muskiet FAJ, Duttis AJ, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in sickle cell disease are related to the hemolytic phenotype. *Blood Cell Mol Dis*. 2010;44(4):229–32.
16. Mohan JS, Lip GYH, Blann AD, Bareford D, Marshall JM. Endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilatation of the cutaneous circulation in sickle cell disease. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(5):546–51.
17. Charlot K, Romana M, Moeckesch B, Jumeat S, Waltz X, Druvalle-Doumido L, et al. Which side of the balance determines the frequency of vaso-occlusive crises in children with sickle cell anemia: blood viscosity or microvascular dysfunction? *Blood Cells Mol Dis*. 2016;56(1):41–5.
18. Minniti CP, Delaney KMH, Gorbach AM, Xu D, Lee CCR, Maltk N, et al. Vasculopathy, inflammation, and blood flow in leg ulcers of patients with sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 2014;89(1):1–6.
19. Moeckesch B, Connes P, Charlot K, Skinner S, Hardy-Dessources MD, Romana M, et al. Association between oxidative stress and vascular reactivity in children with sickle cell anaemia and sickle haemoglobin C disease. *Br J Haematol*. 2017;178(3):468–75.
20. Romana M, Remtuy K, Moeckesch B, Charlot K, Hardy-Dessources MD, Doumido L, et al. Loss of alpha globin genes is associated with improved microvascular function in patients with sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 2021;96(5):E165–E168.
21. Fromy B, Sigaudou-Roussel D, Gaubert-Dahan ML, Rousseau P, Abraham P, Benzoni D, et al. Aging-associated sensory neuropathy alters pressure-induced vasodilation in humans. *J Invest Dermatol*. 2010;130(3):849–55.
22. Christensen SL, Hansen RB, Storm MA, Olesen J, Hansen TF, Ostipov M, et al. Von Frey testing revisited: provision of an online algorithm for improved accuracy of 50% thresholds. *Eur J Pain*. 2020;24(4):783–90.
23. Williams B, Mancia G, Sperting W, Agabiti Rosati E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018;39(33):3021–104.
24. Lamarre Y, Lalanne-Mistrh ML, Romana M, Lemonne N, Mougenel D, Waltz X, et al. Male gender, increased blood viscosity, body mass index and triglyceride levels are independently associated with systemic relative hypertension in sickle cell anemia. *PLoS One*. 2013;8(6):e66004.
25. Gordeuk VR, Sachdev V, Taylor JG, Gladwin MT, Kato G, Castro OL. Relative systemic hypertension in patients with sickle cell disease is associated with risk of pulmonary hypertension and renal insufficiency. *Am J Hematol*. 2008;83(1):15–8.
26. Conte MS, Bradbury AW, Kolh P, White JV, Dick F, Fitrudge R, et al. Global vascular guidelines on the Management of Chronic Limb-Threatening Ischemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2019;58(1S):S1–S109.e33.
27. Leenstra B, Wijnand J, Verhoeven B, Konig O, Teraa M, Verhaar MC, et al. Applicability of transcutaneous oxygen tension measurement in the assessment of chronic limb-threatening ischemia. *Angiology*. 2020;71(3):208–16.
28. Roustitt M, Cracowski JL. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34(7):373–84.
29. Skinner SC, Diaw M, Pialoux V, Mbaye MN, Mury P, Lopez P, et al. Increased prevalence of type 2 diabetes-related complications in combined type 2 diabetes and sickle cell trait. *Diabetes Care*. 2018;41(12):2595–602.
30. Minniti CP, Kato GJ. Critical reviews: how we treat sickle cell patients with leg ulcers. *Am J Hematol*. 2016;91(1):22–30.
31. Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest*. 2017;127(3):750–60.
32. Pule GD, Mowla S, Novitzky N, Wylson CS, Wonkam A. A systematic review of known mechanisms of hydroxyurea-induced fetal hemoglobin for treatment of sickle cell disease. *Expert Rev Hematol*. 2015;8(5):669–79.
33. Minniti CP, Taylor JG, Hildesheim M, O'Neal P, Wilson J, Castro O, et al. Laboratory and echocardiography markers in sickle cell patients with leg ulcers. *Am J Hematol*. 2011;86(8):705–8.
34. Posthauer ME, Banks M, Dorner B, Schols JMGA. The role of nutrition for pressure ulcer management: national pressure ulcer advisory panel, European pressure ulcer advisory panel, and pan pacific pressure injury alliance white paper. *Adv Skin Wound Care*. 2015;28(4):175–88; quiz 189–90.
35. Ashmore DL, Rashid A, Wilson TR, Halliday V, Lee MJ. Identifying malnutrition in emergency general surgery: systematic review. *BJS Open*. 2023;7(5):zrad086.
36. Beidler SK, Douillet CD, Berndt DF, Keagy BA, Rich PB, Marston WA. Inflammatory cytokine levels in chronic venous insufficiency ulcer tissue before and after compression therapy. *J Vasc Surg*. 2009;49(4):1013–20.
37. Olerud JE, Pecoraro RE, Burgess EM, McKnight B, Wyss CR, Reiber GE, et al. Reliability of transcutaneous oxygen tension (TcPO₂) measurements in elderly normal subjects. *Scand J Clin Lab Invest*. 1987;47(6):535–41.
38. Nemeth AJ, Falanga V, Alstadt SP, Eaglstein WH. Ulcerated edematous limbs: effect of edema removal on transcutaneous oxygen measurements. *J Am Acad Dermatol*. 1989;20(2 Pt 1):191–7.
39. Holowatz LA, Thompson CS, Minson CT, Kenney WL. Mechanisms of acetylcholine-mediated vasodilation in young and aged human skin. *J Physiol*. 2005;563(Pt 3):965–73.
40. Cracowski JL, Roustitt M. Current methods to assess human cutaneous blood flow: an updated focus on laser-based-techniques. *Microcirculation*. 2016;23(5):337–44.
41. Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, et al. Endothelial function and dysfunction. Part I: methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the working group on endothelin and endothelial factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2005;23(1):7–17.
42. Leslie SJ, Affolter J, Denver MA, Webb DJ. Validation of laser Doppler flowmetry coupled with intra-dermal injection for investigating effects of vasoactive agents on the skin microcirculation in man. *Eur J Clin Pharmacol*. 2003;59(2):99–102.
43. Senet P, Blas-Chatelain C, Levy P, Manea EM, Peschanski M, Mtrault T, et al. Factors predictive of leg-ulcer healing in sickle cell disease: a multicentre, prospective cohort study. *Br J Dermatol*. 2017;177(1):206–11.
44. Gøthgen I, Jacobsen E. Transcutaneous oxygen tension measurement II. The influence of halothane and hypotension. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*. 1978;67:71–5.
45. El Assar M, Angulo J, Vallejo S, Peiró C, Sánchez-Ferrer CF, Rodríguez-Mañas L. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. *Front Physiol*. 2012;3:132.
46. Gaubert ML, Sigaudou-Roussel D, Tartas M, Berrut G, Saumet JL, Fromy B. Endothelium-derived hyperpolarizing factor as an in vivo back-up mechanism in the cutaneous microcirculation in old mice. *J Physiol*. 2007;585(Pt 2):617–26.

47. Möckesch B, Charlot K, Jumez S, Romana M, Divialle-Doumou L, Hardy-Dessources MD, et al. Micro- and macrovascular function in children with sickle cell anaemia and sickle cell haemoglobin C disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2017;64:23–9.
48. Raffetto JD. Pathophysiology of chronic venous disease and venous ulcers. *Surg Clin North Am*. 2018;98(2):337–47.
49. Connes P, Möckesch B, Tudor Ngo Sock E, Hardy-Dessources MD, Reminy K, Skinner S, et al. Oxidative stress, inflammation, blood rheology, and microcirculation in adults with sickle cell disease: effects of hydroxyurea treatment and impact of sickle cell syndrome. *Eur J Haematol*. 2021;106(6):800–7.

How to cite this article: Catella J, Turptin E, Connes P, Nader E, Carin R, Martin M, et al. Impaired microvascular function in patients with sickle cell anaemia and leg ulcers improved with healing. *Br J Haematol*. 2024;00:1–11. <https://doi.org/10.1111/bjh.19785>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.