UNIVERSITE DES ANTILLES ET DE LA GUYANE Faculté des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

THÈSE

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université des Antilles et de la Guyane Discipline : Physiologie de l'exercice

Xavier WALTZ

Rhéologie sanguine, microcirculation, oxygénation tissulaire et hypoxémie, au repos et à l'exercice, chez les patients atteints de la drépanocytose

Soutenue le 3 décembre 2012

.....

JURY

- Pr. Stéphane PERREY, Université de Montpellier 1, Rapporteur
- Dr. Cyril MARTIN, Université de Lyon 1, Rapporteur
- Pr. Annie LANNUZEL, Université des Antilles-Guyane
- Dr. Aurélien PICHON, Université Paris 13 Nord
- Pr. Olivier HUE, Université des Antilles-Guyane
- Dr. Philippe CONNES, Université des Antilles-Guyane, Directeur de thèse

Je dédie cette thèse :

A ma famille, mes parents et grands-parents qui m'ont soutenu de très près dans ce travail malgré la distance. Je vous dois tout.

A ma tendre Rafaëlle, toi qui m'as suivi, toi qui chaque jour es à mes côtés et me soutiens par ton amour.

Sans votre soutien indéfectible rien n'aurait été possible...

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein des laboratoires Inserm 665 et ACTES de l'Université des Antilles et de la Guyane. Avant que vous ne débutiez la lecture de cette thèse, je tiens à remercier les nombreuses personnes sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse **Philippe Connes**. Merci à toi pour ta très grande disponibilité, ton dynamisme et ton "humour". Je pense avoir appris (et j'apprends toujours) énormément à tes côtés. Bien que je n'aie eu qu'un seul directeur de thèse dans ma vie je pense que beaucoup de thésards auraient rêvé être à ma place.

Je remercie vivement le professeur **Stéphane Perrey**, d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse. Votre expertise dans les domaines de la physiologie de l'exercice et de l'oxygénation sanguine et tissulaire fait de votre jugement un honneur.

Je remercie vivement le docteur **Cyril Martin**, d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse. Votre expertise dans les domaines de la physiologie de l'exercice et la drépanocytose fait de votre jugement un honneur.

Je remercie vivement le professeur **Annie Lannuzel**, d'avoir accepté de présider le jurry de cette thèse. Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de nourrir le jugement de cette recherche doctorale de vos compétences scientifiques et médicales en neurologie.

Je remercie vivement le docteur **Aurélien Pichon**. Le jeune padawan te remercie pour avoir accepté de collaborer avec nous et d'avoir ajouté une grosse plus-value à mon travail de recherche. Je remercie le professeur **Olivier Hue** pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire ACTES. Merci d'avoir mis à ma disposition les moyens sans lesquels cette thèse n'aurait pu voir le jour.

Je tiens à remercier également Jacques Elion, Claudine Lapouméroulie, Marie-Dominique Hardy-Dessources, Marc Romana, Marie-Laure Blondeau, Lisiane Keclard et Monique Decastel qui m'ont accueilli au sein de l'unité Inserm 763 maintenant fondue au sein l'unité Inserm 665. Je vous remercie sincèrement pour votre soutien en particulier durant la seconde année de ma thèse.

Je tiens à remercier mes camarades de tablée : ma Majesté, MC, Cédric, Steph, Jens, Michelle, Yann, Régine, Kizzy et Rajae. J'ai eu beaucoup de plaisir à partager tous ces bons moments avec vous.

Je remercie **toutes les personnes de l'Inserm S665, du laboratoire ACTES, de l'unité transversale de la drépanocytose, du CIC-EC, de la DRCI et du CHU de Pointe-à-Pitre** sans qui rien n'aurait été possible. An ka di zot mèsi on pil !

Je tiens à remercier très chaleureusement le collectif d'association **"Ensemble contre la Drépanocytose"** et la **Région Guadeloupe** de m'avoir soutenu financièrement après la perte de mon financement. J'espère que mon travail a été à la hauteur de votre aide.

Je remercie également, **les volontaires et les patients** qui ont donné leur temps et leur sang pour cette thèse.

4

Sommaire

Liste des abréviations17
A. Introduction générale21
B. Revue de la littérature
I. La drépanocytose – présentation de la maladie24
I.1 La drépanocytose - généralité24
I.1.1 Historique
I.1.2 La drépanocytose, une hémoglobinopathie26
I.1.3 Diversité des formes de drépanocytose et répartition géographique28
I.2 Conséquences des mutations génétiques de la drépanocytose sur le globule rouge35
I.2.2 Propriétés de l'hémoglobine S (HbS) – de la polymérisation de l'hémoglobine à la
falciformation du globule rouge
I.2.3 Propriétés de l'hémoglobine C
II. La drépanocytose – altérations hématologiques et hémorhéologiques43
II.1 Les paramètres hématologiques et leurs altérations chez le patient atteint de
drépanocytose43
II.1.1 Le plasma44
II.1.2 Les Eléments figures
II.2 Les paramètres hémorhéologiques et leurs altérations chez le patient atteint de
drépanocytose
II.2.1 Mécanique des fluides : contrainte de cisaillement, vitesse de cisaillement e
vitesse d'écoulement55
II.2.2 La viscosité sanguine57
II.2.3 Les facteurs influençant la viscosité sanguine60
Ę

II.3 Conclusion
III. manifestations cliniques de la drépanocytose75
III.1 Syndrome drépanocytaire majeur SS et syndrome drépanocytaire majeur SC : deux
pathologies distinctes ?75
III.2 Hypoxémie arterielle chez les patients drépanocytaires - lien possible avec les
alterations hémorheologiques ?83
III.2.1 Causes de l'hypoxémie artérielle chez les patients drépanocytaires
III.2.2 Conséquences de l'hypoxémie84
III.3 complications cérébrovasculaires chez les patients drépanocytaires - lien possible
avec les alterations hemorheologiques ?86
III.3.1 Incidences des complications cérébrovasculaires
III.3.2 Prévention et prise en charge des complications cérébrovasculaires
IV. Transport de l'oxygène et régulation de l'oxygénation tissulaire
IV.1 Transport de l'oxygène96
IV.1.1 Transport de l'oxygène par le système respiratoire
IV.1.2 Transport d'oxygène par le système cardiovasculaire
IV.1.3 Couplage cardiorespiratoire et hypoxémie artérielle
IV.2 Régulation de l'oxygénation tissulaire115
IV.2.1 Régulation de l'oxygénation tissulaire au niveau de la microcirculation116
V. Effets des paramètres Hématologiques et hémorhéologiques sur la vasomotricité et
l'oxygénation tissulaire
V.1 Effet de l'hématocrite159
V.1.1 Effet de l'hématocrite sur la vasomotricité159
V.1.2. Effet de l'hématocrite sur l'oxygénation tissulaire160

V.2 Effet du plasma161
V.2.1 Viscosité plasmatique, viscosité sanguine et contraintes de cisaillements161
V.2.2 Viscosité plasmatique, migration axiale et conséquences sur la vasomotricité,
l'hémodynamique et la diffusion d'oxygène dans la microcirculation161
V.3 Effet de la déformabilité érythrocytaire170
V.3.1 Interaction entre déformabilité érythrocytaire et vasomotricité dans la circulation
artérielle170
V.3.2 Déformabilité érythrocytaire, recrutement capillaire et oxygénation tissulaire171
V.4 Effets de l'agrégation érythrocytaire172
V.7 Conclusions
VI. Exercice et drépanocytose
VI.1 Interaction entre activité physique et les paramètres hémorheologiques chez les
sujets sportifs178
VI.1.1 Influence des paramètres hémorhéologiques sur la performance aérobie178
VI.1.2 Conséquences de l'exercice physique aigu et chronique sur les paramètres
hémorhéologiques chez les sportifs179
VI.2 Balance bénéfices/risques de l'exercice chez les patients atteints de la drépanocytose
VI.2.1 Risques liés à l'activité physique chez les patients drépanocytaires
VI.2.2 Bénéfices liés à l'activité physique chez les patients drépanocytaires
C. Contribution personnelle
VII. Problématique et hypothèses générales de la thèse187
VIII. Liste des publications
VIII.1 Publications principales190
VIII.2 Publications secondaires

VIII.3 Communications orales	192
IX. Matériels et méthodes	193
IX.1 Aspects réglementaires et financements	193
IX.2 Population étudiée	193
IX.2.1 Etude n°1	193
IX.2.2 Etude n°2	195
IX.2.3 Etude n°3	196
IX.2.4 Etude n°4	198
IX.3 Matériels et méthodes hématologiques (Etudes n°1, 2, 3 et 4)	199
IX.3.1 La numération formule sanguine, réticulocytes et plaquettes	199
IX.3.2 Mesure de l'hématocrite	199
IX.2 Matériels et méthodes hémorhéologiques (Etudes n°1, 2, 3 et 4)	200
IX.2.1 Le prélèvement sanguin	200
IX.2.2 Analyse et oxygénation de l'échantillon	200
IX.2.3 La viscosité sanguine	201
IX.2.4 Mesure de déformabilité érythrocytaire par ektacytométrie (Laser Assis	sted Optical
Rotational Cell Analyzer, LORCA)	203
IX.2.5 Agrégation/désagrégation érythrocytaire par réflexion laser (LORCA)	208
IX.3 Techniques de mesure de l'oxygenation sanguine et tissulaire	214
IX.3.1 Introduction	214
IX.3.2 Propriétés et intérêts de la lumière du proche infrarouge	216
IX.3.3 La spectroscopie dans le proche infrarouge (SPIR) - Etudes n°3 et 4	217
IX.3.4 Mesure de la saturation artérielle en oxygène (Etudes n°1,2,3 et 4)	229
IX.4 Le test de marche de 6 minutes - Etude n°2	236
Préparation du parcours	236
	8

Avant de commencer le test237
Explication du déroulement du test au patient237
IX.5 Mesure de la force et de la fatigabilité du muscle fléchisseur superficiel des doigts -
Etude n°4239
IX.6 Test d'effort triangulaire conduit jusqu'au premier seuil ventilatoire - Etude n°4241
IX.7 Statistiques243
IX.7.1 Etude n°1243
IX.7.2 Etude n°2244
IX.7.3 Etude n°3246
IX.7.3 Etude n°4246
X. Présentations des etudes248
X.1 Etude n°1248
X.2 etude n°2
X.3 Etude n°3
X.4 Etude n°4
XI. Conclusion générale et perspectives de cette thèse
XI.1 Conclusion générale
XI.2 Perspectives
D. Références

Figures du manuscrit

Figure 1 : Photo prise par James B. Herrick en 1910 montrant pour la première fois la présence de globules rouges en forme de faucilles chez un patient drépanocytaire.

Figure 2 : Site de production et type d'hémoglobine synthétisée durant les périodes prénatales et postnatales.

Figure 3 : Distribution globale des hémoglobinopathies

Figure 4 : Distribution et fréquence du gène β^{s} .

Figure 5 : Structure d'un polymère d'hémoglobine S.

Figure 6 : Vitesse de polymérisation et morphologie du globule rouge.

Figure 7 : Présentation d'un drépanocyte irréversible sous sa forme oxygénée.

Figure 8 : Présentation d'un drépanocyte irréversible sous sa forme désoxygénée.

Figure 9 : Cristaux observés dans l'hémolysat de patients ayant de l'hémoglobine C.

Figure 10 : Hétérogénéité des érythrocytes de patients drépanocytaire de génotype SC.

Figure 11 : Erythrocytes de patients drépanocytaires de génotype SC vus au microscope électronique

Figure 12 : Effet de l'hématocrite sur la viscosité sanguine à faible vitesse de cisaillement.

Figure 13 : Effet de l'hématocrite sur la viscosité sanguine en fonction de la vitesse de cisaillement.

Figure 14 : Présentation d'un érythrocyte normal.

Figure 15 : Evolution du VGM en fonction de l'âge chez des enfants AA, SC et SS.

Figure 16 : Evolution de la CCMH en fonction de l'âge chez des enfants AA, SC et SS.

Figure 17 : Séparation des érythrocytes par gradient de densité sur Percoll-Stractan.

Figure 18 : Evolution de la concentration d'hémoglobine en fonction de l'âge chez des enfants AA, SC et SS.

Figure 19 : Contrainte de cisaillement, vitesse de cisaillement et vitesse d'écoulement d'un fluide dans un vaisseau sanguin.

Figure 20 : Différences de vitesses entre les différentes couches constituant l'échantillon sanguin sur toute la largeur du vaisseau.

Figure 21 : Exemples d'évolution de la viscosité sanguine pour un fluide rhéofluidifiant thixotrope.

Figure 22 : Représentation d'un érythrocyte lors de son passage dans un capillaire.

Figure 23 : Représentation d'agrégats érythrocytaires en deux dimensions et en trois dimensions.

Figure 24 : Effet de la déformabilité et de l'agrégation érythrocytaire sur la viscosité sanguine en fonction de la vitesse de cisaillement.

Figure 25 : Représentation du phénomène de migration axiale.

Figure 26 : Représentation du phénomène d'inversion de l'effet Fahraeus-Lindqvist.

Figure 27 : Complexité des interactions entre les paramètres hématologiques et hémorhéologiques.

Figure 28 : Figure présentant deux sous-phénotypes cliniques dans la population drépanocytaire.

Figure 29 : Modifications proposées par notre équipe du modèle des deux sous-phénotypes cliniques de Gladwin.

Figure 30 : Variation du niveau d'hypoxémie artérielle mesuré chez les patients drépanocytaires selon la technique de mesure employée

Figure 31 : Courbe représentant la proportion de sujets drépanocytaires n'ayant pas eu d'AVC en fonction de l'âge.

Figure 32 : Incidence de la survenue d'un AVC ischémique ou hémorragique en fonction de l'âge chez les sujets drépanocytaires de génotype SS.

Figure 33 : Protocole de prise en charge des complications cérébrales au service de pédiatrie du CHU de Pointe-à-Pitre.

Figure 34 : Consommation d'oxygène par le tissu cérébral chez les patients drépanocytaires.

11

Figure 35 : Figure représentant le niveau de saturation en oxygène dans la microcirculation cérébrale chez des patients SS comparés à des sujets AA ayant un niveau d'hémoglobine comparable.

Figure 36 : Courbe de dissociation de l'hémoglobine.

Figure 37 : Effet de la température, de la pression partielle du CO₂ et du pH sanguin sur la courbe de dissociation de l'hémoglobine.

Figure 38 : Mécanisme du couplage ventilation perfusion.

Figure 39 : Représentation de la structure d'un acinus pulmonaire.

Figure 40 : Relation entre la capacité de diffusion pulmonaire de l'oxygène, le nombre d'érythrocytes dans un même capillaire et la répartition spatiale des érythrocytes dans ce capillaire.

Figure 41 : Saturation artérielle en oxygène en fonction du ratio capacité de diffusion alvéolo-capillaire de l'oxygène/ débit sanguin pulmonaire.

Figure 42 : Modélisation de l'apport d'oxygène par Krogh et vision actuelle du transport et de la diffusion d'oxygène.

Figure 43 : Impact de la diffusion artériolaire de l'oxygène vers les tissus sur la distribution de l'oxygène dans les vaisseaux en aval.

Figure 44 : Régulation du flux sanguin par le métabolisme tissulaire.

Figure 45 : Mécanisme de régulation du flux sanguin par les érythrocytes.

Figure 46 : Mécanisme de mécanotransduction endothéliale

Figure 47 : Représentation de l'activité endothéliale du vasomotion dans le temps en lien avec les variations de la saturation en oxygène de l'hémoglobine et les variations de concentration d'oxyhémoglobine.

Figure 48 : Représentation du flowmotion et du vasomotion au repos et durant une stimulation corticale.

Figure 49 : Importance du vasomotion dans les échanges de fluide entre tissus et capillaires.

12

Figure 50 : Représentation du polygone de Willis.

Figure 51 : Représentation d'une artère sous-arachnoïdienne donnant naissance à une artériole du parenchyme.

Figure 52 : Représentation schématique des différents types de nerfs périvasculaires.

Figure 53 : Représentation de l'unité fonctionnelle neurovasculaire.

Figure 54 : Représentation des différentes voies de signalisation cellulaire par lesquelles le glutamate régule le flux sanguin cérébral.

Figure 55 : Régulation de la production de vasoconstricteur 20-HETE et du facteur relaxant de l'endothélium EET par le NO.

Figure 56 : Régulation de la production de facteurs relaxants ou contractants de l'endothélium par le niveau d'oxygène.

Figure 57 : Effet de la production de lactate sur les voies de signalisation neurovasculaires.

Figure 58 : Représentation des péricytes au niveau des capillaires cérébraux.

Figure 59 : Comparaison entre flowmotion cérébrale et autorégulation cérébrale mesurés au repos.

Figure 60 : Représentation de l'autorégulation cérébrale

Figure 61 : Influence du système nerveux sympathique sur l'autorégulation cérébrale.

Figure 62 : Viscosité sanguine apparente chez le chien déterminée simultanément *in vitro* à l'aide d'un viscosimètre et *in vivo* sur une préparation des membres postérieurs.

Figure 63 : Epaisseur du manchon plasmatique en fonction de l'hématocrite systémique.

Figure 64 : Simulation du phénomène de migration axiale dans la microcirculation en fonction de la déformabilité et de l'agrégation érythrocytaire.

Figure 65 : Variation de la concentration de NO en fonction de la distance par rapport au centre du vaisseau et ce pour différents hématocrites.

Figure 66 : Production de NO au niveau de la paroi vasculaire en fonction des contraintes de cisaillement générées par l'hématocrite.

Figure 67 : Migration axiale et écrémage plasmatique.

Figure 68 : Altérations des résistances à l'écoulement sanguin en réponse à une diminution de la déformabilité érythrocytaire.

Figure 69 : Relation entre agrégation érythrocytaire et résistance à l'écoulement.

Figure 70. Interactions entre les paramètres hémorhéologiques, l'endothélium, la vasomotricité et l'oxygénation tissulaire.

Figure 71 : Hémolyse en fonction des contraintes de cisaillement chez des sujets contrôle, drépanocytaires SC et drépanocytaires SS.

Figure 72 : Réglette de mesure de l'hématocrite.

Figure 73 : Viscosimètre cône-plan Brookfield, modèle LVDV-II+PRO.

Figure 74 : Principe de fonctionnement du viscosimètre cône-plan.

Figure 75 : Laser Assisted Optical Rotational Cell Analyzer, LORCA.

Figure 76 : Courbe de déformabilité en fonction des contraintes de cisaillement.

Figure 77 : Principe de l'ektacytométrie.

Figure 78 : Pattern de diffraction enregistré par la caméra de l'ektacytomètre.

Figure 79 : Mécanisme utilisé par le LORCA pour la mesure de l'agrégation et de la désagrégation érythrocytaire.

Figure 80 : Représentation schématique d'un syllectogramme.

Figure 81 : Technique de détermination du seuil de désagrégation par le LORCA.

Figure 82 : Le spectre électromagnétique et ses applications technologiques dans la vie courante.

Figure 83 : Présentation du NIRO-200.

Figure 84 : Représentation du chemin parcourue par la lumière proche infrarouge entre les deux optodes.

Figure 85 : Les variations d'atténuation des différentes longueurs d'onde émise par le laser du spectroscope dépendent uniquement des variations d'oxygénation de l'hémoglobine. **Figure 86** : Coefficient d'extinction de l'hémoglobine oxygénée et désoxygénée en fonction de la longueur d'onde.

Figure 87 : NIRO-200 et spectroscopie à résolution spatiale.

Figure 88 : Représentation de l'accumulation de désoxyhémoglobine, d'oxyhémoglobine et de l'hémoglobine fonctionnelle totale lors d'une occlusion veineuse.

Figure 89 : Ce graphique montre la relation entre l'absorption de la lumière et les différentes formes d'hémoglobines présentes chez les patients drépanocytaires.

Figure 90 : Causes de la désaturation de l'hémoglobine chez les enfants atteints de la drépanocytose et valeurs obtenues chez ces patients selon la technique de mesure l'oxygénation artérielle utilisée.

Figure 91 : Présentation schématique du doigtier de l'oxymétrie de pouls contenant des diodes émettrices et un photo-détecteur.

Figure 92 : Méthode de détection en temps réel du premier seuil ventilatoire d'après Wasserman.

Figure 93 : Protocole de l'étude n°1.

Figure 94 : Protocole de l'étude n°2.

Figure 95 : Protocole de l'étude n°3.

Figure 96 : Débit sanguin cutané en fonction du temps mesuré par laser doppler vélocimétrie chez des patients drépanocytaire, β^+ -thalassémiques et contrôles.

Figure 97 : Variabilité de la vitesse des globules rouges dans la microcirculation mesurée à la base de l'ongle par microscopie intravitale.

Figure 98 : Protocole de l'étude n°4.

15

Tableaux du manuscrit

Tableau 1 : Comparaison des paramètres hématologiques et hémorhéologiques entre sujetsAA et patients drépanocytaires de génotype SC et SS à l'état de base.

Tableau 2 : Comparaison de la prévalence des complications cliniques entre sujets adultesde génotype SC et SS.

LISTE DES ABREVIATIONS

- γ : vitesse de cisaillement
- η : viscosité sanguine
- τ : contraintes de cisaillement
- 2,3-DPG : 2,3-diphosphoglycérate
- 20-HETE : acide 20-hydroxy-eicosatetraenoique
- AA : Individu de génotype AA présentant 2 allèles A du gène de la β-globine
- A-aPO₂ : gradient de tension alvéolo-capillaire en oxygène
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ADP : adénosine diphosphate
- AI : index d'agrégation érythrocytaire
- AMP : adénosine monophosphate
- AS : Individu porteur du trait drépanocytaire présentant un allèle A et un allèle S du gène de
- la β -globine
- ATP : adénosine triphosphate
- AVC : Accident vasculaire cérébral
- Ca²⁺ : ions calcium
- **CaO**₂ = contenu artérielle en oxygène
- CC : Patient drépanocytaire homozygote CC présentant deux allèles C du gène de la β-

globine

- CCMH : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
- cHb : hémoglobine fonctionnelle totale
- Cl⁻: ions chlorure
- **CMV** : contractions maximales volontaires
- CO2 : dioxyde de carbone
- COHb : carboxyhémoglobine

DL : capacité de diffusion alvéolo-capillaire de l'oxygène

DPF : differential Pathlength factor ou facteur de correction de la distance parcourue par la lumière

EET : acide epoxyeicsatrienoique

EI : index d'élongation érythrocytaire

EMG : électromyographique

Erythrocyte HbAA = érythrocyte contenant de l'hémoglobine A

Erythrocyte HbSC = érythrocyte contenant de l'hémoglobine S et C

Erythrocyte HbSS = érythrocyte contenant de l'hémoglobine S

ET-1 : endothéline-1

fMRI : imagerie par résonance magnétique fonctionnelle

FSHb : Sulfhémoglobine

IRM : image par resonance magnétique

Hb : hémoglobine

HbA : hémoglobine A

HbC : hémoglobine C

HbE : hémoglobine E

HbS : Hémoglobine S

HbO₂: oxyhémoglobine

HHb : désoxyhémoglobine

HIE : hypoxémie artérielle induite par l'exercice

HTA : hypertension artérielle

HTAP : hypertension artérielle pulmonaire

K⁺ = ions potassium

MAP : mean arterial pressure ou pression artérielle moyenne

MetHb : methémoglobine

Mg²⁺: ions magnésium

mGluRs : les récepteurs métabotropiques du glutamate

Na⁺: ions sodium

- **NMDAR** : N-methyl-D-aspartate
- nNOS : oxyde nitrique synthase neuronal
- NO : monoxyde d'azote
- **NOS** : NO-synthase
- O₂ : dioxygène

P50 : pression partielle artérielle en oxygène nécessaire pour que 50 % de l'hémoglobine

- soit saturé en oxygène
- **PaO₂** : pression artérielle en O₂
- PCO₂ : pression partielle en CO₂
- **pg** : picogramme
- PG : prostaglandines
- PO₂ : pression partielle en oxygène
- **PVP** : PolyVinylPyrrolidone
- Q: débit sanguin pulmonaire
- Qc: débit cardiaque
- **QR** : quotient respiratoire
- RMS : root mean square
- SaO₂ : saturation artérielle en oxygène

SC : Patient drépanocytaire hétérozygote composite SC présentant un allèle S et un allèle C

- du gène de la β-globine
- SDM : syndromes drépanocytaires majeurs
- **SpO**₂ : saturation transcutanée en oxygène
- SS : Patient drépanocytaire homozygote SS présentant 2 allèles S du gène de la β -globine
- SPIR : spectroscopie dans le proche infrarouge
- SRS : spectroscopie à résolution spatiale

- TAD : tension artérielle diastolique
- TaO₂ : transport artérielle en oxygène
- TAS : tension artérielle systolique
- TCMH : teneur corpusculaire moyenne en hémoglobin
- tHb : hémoglobine totale
- TM6M : test de marche de 6 minute
- TOI : tissu oxygen index ou saturation en oxygène dans la microcirculation
- **VGM** : volume glomérulaire moyen
- VA : débit alvéolaire
- VCO₂: débit deCO₂ expiré
- VE : débit ventilatoire
- VO2 : consommation en oxygène
- VO_{2max} : consommation maximale en oxygène

A. INTRODUCTION GENERALE

La drépanocytose est une hémoglobinopathie aux formes et aux sévérités cliniques très hétérogènes qui affectent de nombreux organes chez les patients touchés. Pour cette raison le terme de syndrome drépanocytaire majeur est généralement employé. Tous les syndromes drépanocytaires majeurs ont en commun une mutation ponctuelle du gène β -globine appelée mutation β^{S} . Cette mutation β^{S} conduit à la synthèse de la protéine d'hémoglobine S (HbS) caractérisée par sa capacité à polymériser dans sa forme désoxygénée. La polymérisation de l'HbS est l'élément déclencheur de la falciformation du globule rouge et conduit à de nombreuses altérations hématologiques et hémorhéologiques. Ces dernières sont à l'origine de troubles de l'hémodynamique, de l'oxygénation sanguine et de la perfusion tissulaire en oxygène. Il en résulte de nombreuses complications aigues (p. ex. crise vaso-occlusive, accident vasculaire cérébral, syndrome thoracique aigu etc.) et/ou chroniques (p. ex. dysfonction rénale, ostéonécrose de la tête fémorale etc.) causés par un défaut d'oxygénation des tissus.

La désoxygénation de l'HbS, et les processus de polymérisation et de falciformation qui en découlent, sont donc au centre des complications que connaissent les patients touchés par la drépanocytose. Cette désoxygénation est favorisée par plusieurs facteurs comme l'acidose, l'hyperthermie, ou la déshydratation. Or, ces facteurs sont précipités par une activité physique. Dans ce cadre, l'exercice physique est un facteur de risque important et explique sa contrindication. Cependant, dans le même temps, de nombreuses études tendent à montrer, chez le sujet sain, que si un exercice aigu est à l'origine d'altérations hématologiques et hémorhéologiques, un entraînement, quant à lui, est à l'origine de leur amélioration.

Ainsi, les enjeux de cette thèse ont été de mieux comprendre les implications des altérations hématologiques et hémorhéologiques sur les troubles de l'hémodynamique, de l'oxygénation sanguine et tissulaire et d'autre part de définir précisément une modalité d'exercice limitant les risques hématologiques et hémorhéologiques liés à l'activité physique. Ceci dans l'optique de définir un protocole d'entraînement à des fins thérapeutiques.

Afin de permettre la compréhension des choix expérimentaux qui ont été les nôtres, dans les quatre études qui forment cette thèse, nous allons présenter une revue de la littérature composée de six parties. Dans la première partie, nous présenterons les généralités liées à la maladie, ainsi que les conséquences de la mutation β^{s} sur les érythrocytes des patients atteints du syndrome drépanocytaire majeur homozygote SS et de la combinaison des mutations β^{S} et β^{C} sur les érythrocytes des patients atteints du syndrome drépanocytaire majeur hétérozygote composite SC. Dans une seconde partie, nous traiterons des différents paramètres hématologiques, hémorhéologiques et leurs interactions. Nous décrirons également l'impact des altérations érythrocytaires, causées par les mutations β^{S} et β^{C} , des sujets drépanocytaires SS et SC, sur ces paramètres hématologiques et hémorhéologiques. Puis, dans une troisième partie, nous comparerons les manifestations cliniques des patients drépanocytaires de génotype SS et SC. Les manifestations cliniques étant causées par des troubles de l'oxygénation, nous traiterons dans une quatrième partie, des processus de transport et de régulation de l'oxygénation sanguine et tissulaire. En cinquième partie, nous montrerons l'impact des paramètres hématologiques et hémorhéologiques sur la vasomotricité et l'oxygénation tissulaire. Enfin, dans la dernière partie, nous aborderons les effets de l'exercice physique aigu et chronique sur les paramètres hémorhéologiques ainsi que les bénéfices et risques de l'exercice physique chez les patients atteints de la drépanocytose.

La présentation des résultats expérimentaux obtenus durant ma thèse se fera ensuite au travers de quatre études. L'étude n°1 a été réalisée chez des sujets drépanocytaires de génotype SS. L'objectif était de tester les bénéfices/risques d'un exercice physique triangulaire conduit jusqu'au premier seuil ventilatoire sur les paramètres hématologiques et hémorhéologiques. L'étude n°2 a été réalisée chez une population pédiatrique d'enfants drépanocytaires SC et SS. L'objectif était de tester l'implication des paramètres cliniques, hématologiques et hémorhéologiques dans la survenue d'une hypoxémie au repos et induite par l'exercice. Enfin, les études n°3 et n°4 ont été réalisées chez des adultes drépanocytaires de génotype SC et SS asymptomatiques. L'objectif de ces deux études était de comprendre l'implication des altérations hématologiques et hémorhéologiques de la maladie sur l'hémodynamique et la perfusion tissulaire en oxygène du cerveau (étude n°3) et du muscle (étude n°4).

B. <u>REVUE DE LA LITTERATURE</u>

I. LA DREPANOCYTOSE – PRESENTATION DE LA MALADIE

I.1 LA DREPANOCYTOSE - GENERALITE

I.1.1 HISTORIQUE

La première véritable description de la maladie a été publiée en novembre 1910 à l'école de chirurgie dentaire de Chicago par le médecin James B. Herrick. Il décrit, dans son article intitulé "Peculiar Elongated and Sickle-shaped Red Blood Corpuscles in a Case of Severe Anemia" (172), un patient originaire de Grenade, dans les Caraïbes. Il réalise également une description de ses antécédents familiaux et médicaux avant de rapporter la présence de globules rouges en forme de faucilles (Figure 1) (349).



Figure 1. Cette photo publiée par James B. Herrick en 1910 est la première à montrer la présence de globules rouges en forme de faucilles chez un patient drépanocytaire (172).

Ce patient appelé Walter Clement Noel décéda le 2 mai 1916 à l'âge de 32 ans de ce qui semblait être un syndrome thoracique aigu. En 1911 et 1915, deux autres cas de drépanocytose chez des femmes noires seront également rapportés. En 1917, Emmel découvre la présence de cette maladie chez le père du troisième cas rapporté en 1915 et suggéra la base génétique de cette maladie.

Il faudra attendre la quatrième étude de cas de Mason en 1922 pour que le terme de "sickle cell anaemia" soit employé. Mason fut le premier à faire une revue des quatre premier cas et observa que tous ces sujets sont originaires d'Afrique. Cette observation sera à l'origine de l'idée fausse selon laquelle cette maladie ne peut toucher que les personnes originaires d'Afrique (349).

En 1927, Hahn et Gillespie remarquent que la déformation des globules rouges en forme de faucille, appelée falciformation, a lieu lorsque la pression partielle en oxygène (PO_2) dans le sang est inférieure à 50 mm Hg et que ce phénomène est réversible lorsque que l'on rétablit la PO_2 (156).

Diggs et collaborateurs furent les premiers en 1933 à différencier les cas symptomatiques des cas asymptomatiques alors appelés "sickle cell trait" sans en donner d'explication génétique (349). Neel en 1949, collecta prospectivement des données sur 42 parents de 29 cas de drépanocytose et proposa le caractère monogénique à expression récessive de cette hémoglobinopathie et posa comme hypothèse que le trait drépanocytaire était l'état hétérozygote d'une mutation génétique inconnue (274). La même année Pauling et ses collaborateurs démontrent l'existence d'une hémoglobine à migration anormale (par technique d'électrophorèse) chez ces patients (296) : elle est appelée hémoglobine S pour "Sickle Cell Hemoglobin". La drépanocytose fut ainsi la première maladie décrite au niveau moléculaire. D'autre part, Pauling et ses collaborateurs (296) confirment les travaux de Neel (274), en démontrant que les globules rouges des porteurs du trait drépanocytaire subsistait cependant. En effet, si la drépanocytose est une maladie monogénique récessive, 25

alors sa fréquence devrait être en rapport avec le nombre de personnes porteuses du trait ; ce qui ne semblait pas être le cas. En effet, en Angola, Texeira rapporta une prévalence de 27% d'individus porteurs du trait drépanocytaire alors que la forme active de la maladie est extrêmement rare (349). L'explication de ce phénomène fut apportée par Foy et collaborateurs en 1951 en avançant que cela était du à une mortalité infantile importante chez les individus atteints de drépanocytose (138).

Il faudra attendre les travaux de Ingram en 1956 pour découvrir que l'hémoglobine S est plus positivement chargée que l'hémoglobine A. En 1957, Ingram démontre que l'hémoglobine S contient plus de valine que d'acide glutamique, suggérant qu'il s'agit d'une mutation génétique dans laquelle la valine remplace l'acide glutamique (189). Enfin, c'est en 1977 que cette mutation ponctuelle fut attribuée à la transition d'une base A (adénine) par une base T (thymine) dans le triplet codant pour le sixième codon (GAG-GTG) du gène β -globine codant la chaîne β de l'hémoglobine (244).

I.1.2 LA DREPANOCYTOSE, UNE HEMOGLOBINOPATHIE

La drépanocytose est une maladie qui touche la chaîne β globine de la protéine d'hémoglobine ; il est donc important de faire un rappel sur la protéine d'hémoglobine.

L'hémoglobine est une protéine contenue dans les globules rouges. Cette protéine comprend deux sous unités α et deux sous-unités non- α (β , γ , δ). Chaque sous-unité (ou chaîne polypeptidique) est associée à un noyau porphyrique contenant du fer sous forme ionique (fer ferreux, Fe₂⁺), que l'on désigne sous le nom de groupement hème. Ce noyau porphyrique permet une liaison réversible à l'O₂ sans modification du niveau d'oxydation du fer qu'elle contient (nous reviendrons sur le rôle qu'elle joue dans l'oxygénation tissulaire dans la partie *IV.1.2.1 Globule rouge/hémoglobine et transport d'oxygène*).

Chez le sujet sain adulte, l'hémoglobine se présente sous une forme prédominante, l'hémoglobine A ($\alpha_2\beta_2$), et sous une forme minoritaire, l'hémoglobine A₂ ($\alpha_2\delta_2$). Les gènes du

locus β s'expriment au cours du développement, dans l'ordre dans lequel ils sont placés. Au début de la vie embryonnaire, les chaînes ζ et ε se combinent pour former l'hémoglobine Gower I ($\zeta_2 \varepsilon_2$), les chaînes α et ε s'associent pour former l'hémoglobine Gower II ($\alpha_2 \varepsilon_2$) et les chaînes ζ et γ forment l'hémoglobine Portland ($\zeta_2 \gamma_2$). Puis durant la vie fœtale, la molécule prédominante est l'hémoglobine F ($\alpha_2 \gamma_2$). Puis peu avant la naissance et après la naissance, le taux de chaîne γ chute rapidement au profit des chaînes β . De ce fait, les premiers signes phénotypiques de la drépanocytose ne se manifestent pas avant la substitution des gènes γ par le gène β^s (Figure 2). C'est pour cette raison que les sujets drépanocytaires présentant une persistance de l'hémoglobine fœtale présentent une sévérité clinique moindre.



Figure 2. Site de production et type d'hémoglobine synthétisée durant les périodes prénatales et postnatales. Schéma adapté de (404).

I.1.3 DIVERSITE DES FORMES DE DREPANOCYTOSE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE

I.1.3.1 REPARTITION MONDIALE

D'après l'OMS (1995), 250 millions de personnes sont porteuses d'un gène d'une hémoglobinopathie (thalassémies et drépanocytoses) soit 4,5% de la population mondiale (11) (Figure 3).





Chaque année 300 000 enfants naissent avec une hémoglobinopathie majeure (11). Globalement, la fréquence des gènes thalassémiques est plus fréquente que ceux de la drépanocytose. Le nombre de personnes touchées par la drépanocytose serait de l'ordre de 50 millions à travers le monde. Les prévalences de la drépanocytose et des porteurs du trait drépanocytaire sont les plus élevées en Afrique Centrale et en Afrique de l'Ouest où près de 2% des nouveaux nés sont affectés par la drépanocytose. Cependant, il serait faux de considérer que la drépanocytose se limite uniquement à l'Afrique et qu'elle ne touche que les individus noirs. En effet, la drépanocytose se répartit sur l'ensemble du planisphère (Figure 3) et notamment en méditerranée chez des populations Caucasiennes à peau claire et yeux 28 bleus. Cependant dans ces régions le gène β^{s} est principalement associé à l'haplotype bénin démontrant une origine africaine (voir partie *I.1.3.3 Origine de la drépanocytose*) (349). Nous verrons néanmoins que le gène β^{s} n'est pas le seul impliqué dans les syndromes drépanocytaires majeurs.

I.1.3.2 REPARTITION EN FRANCE METROPOLITAINE ET EN GUADELOUPE

La drépanocytose est la maladie génétique la plus fréquente en France. En 2007, 326 cas de drépanocytose ont été recensés à la naissance soit 1/2065 naissance. La population suivie serait d'environ 10 000 (enfants et adultes) surtout répartie en île de France (145). Plus particulièrement en Guadeloupe, la drépanocytose touche un nouveau-né sur 265 et le nombre d'individus touchés par cette pathologie serait d'environ 1500 personnes (145). En outre, près de 11% de la population est porteuse du trait drépanocytaire (145). La forte prévalence de la drépanocytose en Guadeloupe comparée à celle de la métropole s'explique par l'émigration africaine forcée durant la période de l'esclavage.

En Guadeloupe, en 1984, le dépistage systématique de la drépanocytose à la naissance a été initié par l'Inserm puis a été pris en charge par le Laboratoire du Centre Caribéen de la Drépanocytose lors de sa création en 1990. Depuis 2009, le Centre Caribéen de la Drépanocytose est devenu un service du CHU de Pointe-à-Pitre appelé Unité Transversale de la Drépanocytose.

29

I.1.3.3 ORIGINES DE LA DREPANOCYTOSE

Les différents syndromes drépanocytaires majeurs (SDM) seraient nés suite à plusieurs mutations procurant des avantages sélectifs face à la malaria.

1.1.3.3.1 MUTATION GENETIQUE ET AVANTAGE SELECTIF

La prévalence actuelle du gène β^{s} , au vu de la mortalité importante et précoce des personnes atteintes de la drépanocytose, particulièrement en Afrique où la prise en charge des patients était et reste moins bonne, ne peut s'expliquer que par le fait que les individus hétérozygotes (*c.-à-d.* les porteurs du trait drépanocytaire) ont soit un avantage sélectif, soit un avantage reproductif comparé aux individus qui sont porteurs des gènes β^{A} . L'hypothèse d'une meilleure fertilité a été proposée par le passé mais jamais démontrée de manière convaincante (9, 139).

Raper en 1949, fut le premier à suggérer qu'être porteur du trait drépanocytaire pourrait conférer un avantage sélectif contre certains facteurs environnementaux défavorables à la survie et présents dans les tropiques (329). En 1949, en comparant la carte de répartition de la malaria à celle des hémoglobinopathies, Haldane a constaté une superposition des zones infectées et parla pour la première fois de "balanced polymorphism" pour expliquer que le désavantage de l'état d'homozygotie pouvait être contrebalancé par l'avantage sélectif que procure l'état d'hétérozygotie (157). Aujourd'hui, il a été montré que différentes mutations génétiques conféraient un avantage génétique contre la malaria à savoir les mutations conduisant à l' α -thalassémie, la β -thalassémie, la synthèse d'hémoglobine S (HbS), d'hémoglobine C (HbC) et d'hémoglobine E (HbE) (236). Cependant, II faut préciser qu'il existe plusieurs formes de malaria et que la drépanocytose protège contre la forme *plasmodium falciparum* (*c.-à-d.* une des deux formes les plus virulentes).

Concernant la mutation β^{s} codant pour l'hémoglobine S, il semblerait que la protection des sujets porteurs du trait drépanocytaire face à la malaria *plasmodium falciparum* implique principalement deux mécanismes:

- Premièrement, il a été montré que la croissance intra-érythrocytaire du parasite était inhibée par la polymérisation de l'HbS quand le niveau d'oxygène descend sous les 5% (142).
- Deuxièmement, les érythrocytes des porteurs du trait drépanocytaire sont reconnus et éliminés en plus grand nombre par le système immunitaire quand ils sont affectés par la malaria (67, 334, 355).

Concernant la mutation β^{c} , il semblerait qu'elle réduise de 29% l'infection par la malaria *plasmodium falciparum* à l'état d'hétérozygotie et de 93% à l'état d'homozygotie (258). La protection à l'état d'hétérozygotie est cependant remise en question (ou pour le moins semble moins marquée que pour les sujets hétérozygotes de génotype AS) et les mécanismes en jeu inconnus (236).

L'hypothèse de l'avantage sélectif suppose également que lorsque la malaria n'est plus présente dans l'environnement, le nombre de porteurs du trait drépanocytaire devrait diminuer. C'est ainsi qu'Allison (1954) a suggéré que les noirs Américains avaient durant la traite négrière une prévalence du trait qui excédait les 20% et qu'en 300 ans cette prévalence a été ramenée à 8% (9).

I.1.3.3.2 HAPLOTYPES ET SYNDROMES DREPANOCYTAIRES - DE MULTIPLES ORIGINES ET DE MULTIPLES FORMES DE DREPANOCYTOSE

La forme homozygote SS, bien que la plus répandue (70%), n'est pas la seule forme de drépanocytose. En effet, la drépanocytose peut s'exprimer également en associant la présence de la mutation β^s avec un deuxième allèle muté du gène β . Ces formes constituent

les hétérozygotes composites. Ainsi, le terme de "syndrome drépanocytaire majeur (SDM)" est employé pour regrouper la forme homozygote ainsi que toutes les formes hétérozygotes composites. Enfin, il semblerait que la même mutation β^{s} soit apparue en des lieux et temps différents. Cette hypothèse a émergé suite à la naissance du concept d'haplotype (287).

HAPLOTYPES DE LA MUTATION B^S

Un haplotype est un groupe d'allèles de différentes séquences polymorphes situées sur un même chromosome qui ségrègent ensemble lors de la méiose. Ce groupe de gènes est donc transmis ensemble à la descendance. Ainsi, il a été découvert que le code ADN entourant le locus de la β -globine diffère lorsqu'il est comparé entre différentes populations porteuses du gène β^{S} . Ces polymorphismes de la mutation β^{S} seraient nés au cours du temps dans 5 foyers différents comme en témoigne l'existence de 5 haplotypes pour cette mutation (198). En effet, à chaque fois qu'une mutation β^{S} se produit dans l'histoire, cette mutation a l'opportunité d'être associée avec un nouvel haplotype. Ces haplotypes sont nommés en fonction des aires dans lesquelles ils ont été décrits en premier : Bénin, Sénégal, République d'Afrique Central (Bantu) (290), Cameroun (221) et asiatique (216). Cette hypothèse, est d'autant plus probable que les 5 aires géographiques sont bien séparées les unes des autres (Figure 4).



Figure 4. Distribution et fréquence du gène β^{s} sur lequel a été ajoutée la distribution de 4 des 5 haplotypes de la β -globine. D'après (325).

Ces haplotypes du gène β^s sont sans doute nés avec l'agriculture. En effet, la maîtrise de l'irrigation a certainement permis le développement du moustique *Anopheles* responsable de la malaria (110).

Au niveau, clinique il n'est plus à démontrer que certains haplotypes sont plus graves que d'autres. Ainsi, les individus présentant les haplotypes Sénégal et Asiatique (Arabo-Indien) ont un phénotype clinique moins sévère que l'haplotype Cameroun dont la sévérité est la plus forte. Ainsi, pour une même mutation, la sévérité clinique peut varier fortement. Cette variabilité inter-individuelle de la sévérité clinique ne s'explique cependant pas uniquement par les haplotypes et représente une des caractéristiques majeures de cette maladie.

LES DIFFERENTS SYNDROMES DREPANOCYTAIRES MAJEURS (SDM)

La mutation du gène β^s peut également s'associer avec une autre mutation du gène β globine. On distingue ainsi différents SDM à savoir :

- Le SDM SC : Il représente un peu moins de 30% des SDM (267). La mutation β^c résulte d'une mutation ponctuelle du codon 6 dans laquelle la lysine se substitue à l'acide glutamique. Il semblerait que cette mutation soit née au Burkina-Faso (267).
- le SDM SD Punjab : Bien qu'il existe plusieurs mutants de l'hémoglobine appelés β^D,
 la mutation D Punjab est la seule à être symptomatique lorsqu'elle est associée avec
 la mutation β^S (349). Cette hémoglobine est due à une substitution d'un acide
 glutamique par une glutamine sur le codon 121.
- Le SDM SO Arab : La prévalence la plus élevée est observée en Bulgarie. Ce syndrome relativement rare est dû à la substitution de l'acide glutamique par une lysine sur le codon 121.
- Les SDM Sβ-thal : Il s'agit de l'association d'un gène β^S avec un gène β-thalassémique. Le gène β peut ne pas être exprimé (on parle alors de Sβ⁰ thal) et les symptômes sont similaires à ceux d'un sujet homozygote SS. Mais il peut arriver que le gène soit partiellement exprimé (Sβ⁺ thal) et la sévérité des symptômes va dépendre du taux d'hémoglobine A exprimé.

La liste présentée ici est loin d'être exhaustive et l'on recense de nombreux syndromes plus ou moins rares, tel que le syndrome drépanocytaire CC où l'on recense 8 individus, actuellement en Guadeloupe, suivis à l'Unité Transversale de la Drépanocytose. Ainsi, la drépanocytose est une maladie aux formes et aux sévérités variées.

I.2 CONSEQUENCES DES MUTATIONS GENETIQUES DE LA DREPANOCYTOSE

SUR LE GLOBULE ROUGE.

Les mutations génétiques β^{s} et β^{c} ont des conséquences multiples. Elles affectent le globule rouge (voir ci-dessous) et par voie de conséquence les paramètres hématologiques et hémorhéologiques (voir partie II). Enfin, ces altérations hématologiques et hémorhéologiques perturbent l'hémodynamique et l'oxygénation tissulaire (voir partie V). Les répercutions cliniques de ces mutations seront abordées dans les parties II et III.

I.2.2 PROPRIETES DE L'HEMOGLOBINE S (HBS) – DE LA POLYMERISATION DE

L'HEMOGLOBINE A LA FALCIFORMATION DU GLOBULE ROUGE.

I.2.2.1 LE PROCESSUS DE POLYMERISATION DE L'HEMOGLOBINE S (HBS)

L'hémoglobine S est caractérisée par une substitution où la valine non polaire et hydrophobe remplace l'acide glutamique polaire et hydrophile. Lors du processus de désoxygénation dans la microcirculation, la molécule d'hémoglobine S (HbS) modifie sa configuration et conduit donc à une exposition de la valine hydrophobe avec le milieu aqueux de l'érythrocyte. On estime que la solubilité d'une solution de désoxyhémoglobine S ne représente que 1% de la solubilité de l'oxyhémoglobine S (301) et seulement 10% de la solubilité de la désoxyhémoglobine A (302). Cette faible solubilité de la désoxyhémoglobine S due à l'exposition de la valine dans le milieu aqueux conduit la valine à s'associer avec une niche hydrophobe constituée par la Phe85 et la Leu88 d'une sous-unité β adjacente. Ainsi, l'on observe en condition désoxygénée un assemblage de molécules d'hémoglobines en structures fibreuses tubulaires longues de 1 à 15 nm (166). Ces associations d'HbS peuvent prendre différentes formes (tiges, cristaux, microtubules) et conduisent peu à peu à la formation de polymères d'HbS. On parle ainsi de processus de polymérisation de l'HbS.

Un polymère comprend 7 paires de brins d'hémoglobine S de forme hélicoïdale de 21 nm de diamètre (Figure 5).



Figure 5. Structure d'un polymère d'hémoglobine S composé de 7 paires de brins d'hémoglobine S de forme hélicoïdale de 21 nm de diamètre. D'après (119).

I.2.2.2 CINETIQUE DE LA POLYMERISATION DE L'HEMOGLOBINE S

Le mécanisme de polymérisation implique la formation d'un noyau critique d'agrégats d'hémoglobine pour que la polymérisation soit initiée (120, 176). La formation de ce noyau requiert une période de latence qui est fonction de nombreux facteurs tels que la concentration intra-érythrocytaire en hémoglobine, la pression partielle en oxygène, la concentration en 2,3-DPG, le pH, la température et la nature des hémoglobines en présence. Le délai nécessaire pour l'initiation de la polymérization est un facteur critique dans le phénomène de falciformation des globules rouges (263). En outre, la vitesse de polymérisation détermine également la forme du globule rouge falciformé (Figure 6).


Figure 6. Vitesse de polymérisation et morphologie du globule rouge. Une polymérisation lente conduit à la formation de longs polymères d'hémoglobine S alignés parallèlement à l'intérieur du globule rouge qui prend alors une forme de faucille ("sickle"). Une polymérisation plus rapide donne naissance à des fibres alignées mais de plus petite taille. Le globule rouge prend alors une forme de feuille de houx ("holly leaf"). Enfin, une polymérisation rapide donne lieu à des fibres d'hémoglobine S réparties dans le globule rouge de manière aléatoire. Le globule rouge prend alors une forme de forme granulaire ("granular"). D'après (119).

1.2.2.3 CONSEQUENCES DE LA POLYMERISATION POUR LE GLOBULE ROUGE

1.2.2.3.1 ALTERATIONS DU CYTOSQUELETTE ET FRAGILISATION DU L'ERYTHROCYTE

Le processus de polymérisation génère des fibres rigides d'HbS. Ces fibres vont conduire à la falciformation du globule rouge mais vont également générer des dommages au niveau du cytosquelette de la membrane érythrocytaire. Quand les dommages sont limités, le globule rouge peut reprendre sa forme initiale. C'est le cas pour les discocytes. Cependant, à chaque cycle de falciformation et défalciformation du globule les dommages augmentent 37

jusqu'à former une falciformation irréversible du globule rouge (Figure 7 et 8). Les dommages occasionnés au cytosquelette augmentent également la fragilité du globule rouge (24). Ainsi la durée de vie d'un globule rouge contenant de l'HbS est de l'ordre de 15 jours (247, 248) contre 120 jours pour un globule rouge normal contenant de l'hémoglobine A (HbA).



Figure 7. Globule rouge falciformé de manière irréversible présenté ici sous sa forme oxygénée. L'alignement des polymères d'hémoglobine S est bien marqué. D'après (45).



Figure 8. Globule rouge falciformé de manière irréversible présenté ici sous sa forme désoxygénée. Les polymères d'hémoglobine S ne sont plus visibles mais la membrane reste déformée. D'après (45).

1.2.2.3.2 DESHYDRATATION DU GLOBULE ROUGE

La déshydratation des érythrocytes contenant de l'HbS, résulte d'une perte nette d'ions K⁺ accompagnée d'une perte d'ions Cl⁻ et d'eau afin de retrouver rapidement un équilibre électrochimique et osmotique. D'autre part, la concentration intra-érythrocytaire d'hémoglobine augmente lorsque le globule rouge est déshydraté, facilitant ainsi la polymérisation de l'HbS. Cette polymérisation de l'HbS déclenche ensuite un cercle vicieux en provoquant une perméabilisation non sélective aux cations Na⁺, K⁺, Mg²⁺, et Ca²⁺ (259). Cette perméabilisation va être le déclencheur d'une réaction en chaîne d'activation de canaux ioniques en particulier le canal Gardos ou canal K⁺- calcium dépendant et le co-transporteur K⁺/Cl⁻ qui vont amplifier la perte d'ions K⁺ et donc par conséquent entraîner une perte d'eau et d'ions Cl⁻ (58).

I.2.3 PROPRIETES DE L'HEMOGLOBINE C

I.2.3.1 CRISTALISATION DE L'HEMOGLOBINE C

L'hémoglobine C avec l'hémoglobine S et l'hémoglobine E est une des trois hémoglobines anormales les plus fréquentes. Une des particularités de l'hémoglobine C est sa capacité à former des cristaux du fait de sa faible solubilité (349) (Figure 9).



Figure 9. Cristaux observés dans l'hémolysat de patients ayant de l'hémoglobine C. D'après (266).

Ci-dessous deux représentations de globules rouges visibles chez les patients drépanocytaires de génotype SC (Figures 10 11) présentant des globules rouges en forme de cristaux, de boules de billard et des globules rouges pliés (223). Chez les sujets drépanocytaires de génotype SC, la cristallisation de l'hémoglobine C est accélérée par la présence d'HbS (229) et par l'augmentation de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (267).

Néanmoins, il est à noter que l'apparition de cristaux répond à plusieurs facteurs :

- Elle n'a lieu chez les patients drépanocytaire de génotype SC qu'après splénectomie (267).
- Elle ne se produit que lorsque l'hémoglobine est oxygénée ce qui limite les risques au niveau de la microcirculation (131, 267).
- Enfin, les probabilités de formation de cristaux diminuent avec l'augmentation de la concentration d'HbF (267).



Figure 10. Les érythrocytes de patients drépanocytaires de génotype SC peuvent présenter des formes très hétérogènes. 1 = érythrocytes contenant des cristaux avec des arrêtes bien tranchées, 2 = érythrocytes en forme de boules de billard, 3 = érythrocytes repliés. D'après (223).



Figure 11. Erythrocytes de patients drépanocytaires de génotype SC vus au microscope électronique. A = érythrocytes HbSC repliés plusieurs fois, B = érythrocyte HbSC replié une seule fois, C = Erythrocyte HbSC alvéolé, appelé cellule triangulaire ou knizocyte. D'après (223).

I.2.3.2 PROPRIETES DES GLOBULES ROUGES CONTENANT DE L'HEMOGLOBINE C

Les globules rouges contenant uniquement de l'HbC sont des cellules microcytaires (*c.-à-d.* volume glomérulaire moyen faible) et hyperchromiques (*c.-à-d.* concentration corpusculaire

moyenne en hémoglobine élevée). Ces globules rouges sont caractérisés par une fuite d'ions K^+ , due à une activité importante des transporteurs K^+CI^- , entraînant une déshydratation du globule rouge. Ce phénomène est moins prononcé chez les sujets de génotype AC et SC (267).

L'affinité de l'HbC pour l'oxygène est légèrement réduite avec une P50 (*c.-à-d.* pression partielle nécessaire pour que 50% de l'hémoglobine soit oxygénée) à 29,5 mmHg contre 35,8 mmHg pour l'HbS et 26,5 mmHg pour l'HbA (267). Cette réduction de l'affinité de l'HbC pour l'oxygène est attribuée à un pH intra-cellulaire plus faible et une concentration de 2-3-DPG plus élevée.

Du fait de la déshydratation, la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) est très élevée chez les sujets ayant de l'hémoglobine C (*c.-à-d.* érythrocytes HbCC = 38 g/dL, érythrocytes HbSC = 37 g/dL, érythrocytes HbAC = 34 g/dL, érythrocytes HbAA = 33 g/dL) (267).

La durée de vie moyenne des érythrocytes HbSC est de 28,9 jours contre 15 jours pour les érythrocytes HbSS (247, 248). En outre, une falciformation irréversible des érythrocytes HbSC est moins fréquente que pour les érythrocytes HbSS.

II. LA DREPANOCYTOSE – ALTERATIONS HEMATOLOGIQUES ET HEMORHEOLOGIQUES

Nous avons vu que les mutations génétiques β^{s} et β^{c} se traduisent par des altérations du globule rouge. Ces dernières conduisent à des altérations hématologiques et hémorhéologiques. Nous allons voir dans cette partie les différents paramètres hématologiques, hémorhéologiques, leurs interactions et brièvement leur niveau d'altération chez les patients atteints de la drépanocytose.

L'hématologie est une spécialité médicale consacrée à l'étude du sang d'un point de vue anatomique, histologique, physiologique et pathologique. L'hématologie est donc un champ très large et les maladies hématologiques sont très nombreuses. La drépanocytose est l'une d'entre elles.

L'hémorhéologie, quant à elle, est une branche de la rhéologie étudiant les propriétés biophysiques et les modalités de l'écoulement du sang dans la circulation sanguine tant au niveau de la macro- que de la microcirculation (90). Les altérations hématologiques et hémorhéologiques sont liées dans la drépanocytose.

II.1 LES PARAMETRES HEMATOLOGIQUES ET LEURS ALTERATIONS CHEZ LE PATIENT ATTEINT DE DREPANOCYTOSE.

Les propriétés du flux sanguin sont complexes. Cette complexité provient du fait que le sang contient de nombreux éléments (les éléments figurés), suspendus dans une solution aqueuse (le plasma).

II.1.1 LE PLASMA

Le plasma humain est un fluide généralement de couleur claire qui prend souvent une teinte jaune chez les patients drépanocytaires. Le plasma contient un nombre important de solutés qui jouent un rôle important dans le maintien de l'osmolarité du sang et donc dans le maintien du volume des globules rouges. Parmi, les protéines plasmatiques nous ne citerons que le fibrinogène qui joue un rôle important dans la coagulation mais également dans l'agrégation érythrocytaire.

II.1.2 LES ELEMENTS FIGURES

Les éléments figurés comprennent trois types de cellules : les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes. Le volume occupé par les éléments figurés du sang, principalement les globules rouges, définit l'hématocrite. L'hématocrite est un paramètre hématologique qui a une influence importante sur la rhéologie du sang. En effet, l'hématocrite est le plus important déterminant de la viscosité sanguine, mesurée *in vitro*, notamment à faible vitesse de cisaillement (Figure 12).



Figure 12. Effet de l'hématocrite sur la viscosité sanguine à faible vitesse de cisaillement.

Mesures réalisées in Vitro. D'après (28).

Par exemple, pour une vitesse de cisaillement de 0,01 s⁻¹, une augmentation de l'hématocrite de 20 à 50% multiplie par 9 la viscosité sanguine alors qu'à une vitesse de cisaillement plus élevée (20 s^{-1}), la même augmentation d'hématocrite augmente la viscosité sanguine de 3 fois (87). En outre, le caractère non-newtonien du sang est amplifié avec l'augmentation de l'hématocrite. En effet à 20% d'hématocrite, la viscosité sanguine diminue de 6 fois entre 0,1 et 20 s⁻¹, tandis que la viscosité sanguine est diminuée de 20 fois dans le même intervalle de vitesse de cisaillement à 50% d'hématocrite (87) (Figure 13).



Figure 13. Effet de l'hématocrite sur la viscosité sanguine en fonction de la vitesse de cisaillement ("shear rate"). La vitesse de cisaillement est augmentée progressivement de $0,01 \ge 20 \text{ s}^{-1}$. D'après (87).

L'hématocrite tel qu'il est mesuré en laboratoire appelé parfois "hématocrite systémique" (90) ne rend cependant pas compte des variations d'hématocrite en fonction du territoire vasculaire. Nous verrons en partie V, par exemple, que dans la microcirculation l'hématocrite local est plus faible (c.-à-d. effet Fahraeus) (86, 127). Les patients drépanocytaires SS et SC souffrant d'une anémie hémolytique chronique ont un hématocrite plus faible que la population générale non malade (AA) : hématocrite AA (~42%) > SC (~34%) > SS (~25%) (données obtenues par microcentrifugation) (374).

II.1.2.1 LES ERYTHROCYTES

Les érythrocytes ou globules rouges ont, de face, la forme d'un disque, avec un diamètre compris entre 7,2 et 7,9 µm, et de profil, celle d'une lentille biconcave dont l'épaisseur est de 2,4 µm à la périphérie et de 1 µm au centre (114) (Figure 14). Les globules rouges matures ne contiennent pas de noyau ou de mitochondries. Les caractéristiques globales des globules rouges d'un patient sont données par le volume globulaire moyen (VGM), la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), la numération des réticulocytes mais également par la concentration en hémoglobine. Dans le cas de la drépanocytose, la population érythrocytaire est très hétérogène.



Figure 14. Erythrocyte normal vue de profil et de dessus. Voir texte ci-dessus.

II.1.2.1.1 LE VOLUME GLOBULAIRE MOYEN (VGM)

Le volume globulaire moyen est donné par la formule :

VGM = hématocrite (litre d'érythrocyte par litre de sang) / Nombre de globule rouge (10¹²/l)

Sa valeur est exprimée en femtolitres (fl). Elle est normalement de : 80 à 100 fl chez l'adulte; 106 fl chez le nouveau-né; 78 fl chez l'enfant de 1 an ; 84 fl chez l'enfant de 10 ans (114). Si l'on compare les valeurs des patients drépanocytaires adultes, à l'état de base, à ceux de sujets sains, on a : AA (86,2 fl) = SS (84,3 fl) > SC (71,8 fl) (374). Pour l'évolution des valeurs chez l'enfant voir Figure 15. Ainsi, on constate une microcytose marquée des globules rouges SC (*c.-à-d.* VGM inférieur à 80 fl).



Figure 15. Evolution du VGM ("MCV = mean cell volume") en fonction de l'âge chez des enfants AA, SC et SS. D'après (362).

II.1.2.1.2 LA TENEUR CORPUSCULAIRE MOYENNE EN HEMOGLOBINE (TCMH) ET LA CONCENTRATION CORPUSCULAIRE MOYENNE EN HEMOGLOBINE (CCMH)

La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) est donnée par la relation :

TCMH = Hémoglobine (g/l) / nombre de globule rouge
$$(10^{12}/l)$$

La TCMH est exprimée en picogrammes (pg) par cellule et est normalement de : 29,5 pg chez l'adulte, 34 pg chez le nouveau-né, 27 pg chez l'enfant (114). Chez les patients drépanocytaires adultes, à l'état de base, comparés à des sujets AA on a : AA = SS > SC (26,2 pg).

La CCMH est donnée par la relation :

CCMH = hémoglobine (g/dl) / hématocrite (dl d'érythrocytes/dl de sang) ou encore CCMH = hémoglobine / (VGM x nombres de globule rouge)

Elle est exprimée en grammes/décilitre (g/dl) et est normalement comprise entre 31 et 35 g/dl chez l'adulte (114). Chez les patients drépanocytaires, à l'état de base, comparés à des sujets AA on a : AA (33,5 g/dL) < SS (34,6 g/dl) < SC (36,5 g/dl) (374). Pour l'évolution des valeurs chez l'enfant voir Figure 16.



Figure 16. Evolution de la CCMH ("MCHC = mean cell haemoglobin concentration") en fonction de l'âge chez des enfants AA, SC et SS. D'après (362).

La TCMH et la CCMH se différencient par le fait que la CCMH tient compte du VGM dans son calcul (*c.-à-d.* Hématocrite = VGM x nombre de globule rouge) ce qui n'est pas le cas de la TCMH. Ainsi, la CCMH est plus représentative de la densité intra-érythrocytaire en hémoglobine et donc de la densité érythrocytaire. Comme nous l'avons vu dans la partie 49 *I.2.3.2 Propriétés des globules rouges contenant de l'hémoglobine C*, la CCMH élevée (*c.-à-d.* hyperchromie) chez les patients SC est due aux mécanismes de déshydratation du globule rouge (*c.-à-d.* xérocytose). La correspondance entre la CCMH et la densité érythrocytaire peut être observée en réalisant une séparation des érythrocytes par gradient de densité sur Percoll-Stractan (Figure 17).



Figure 17. Séparation des érythrocytes par gradient de densité sur Percoll-Stractan. A noter que les patients SC ont une densité érythrocytaire importante et que l'hétérogénéité la plus importante est observée chez les patients SS.

La CCMH et la densité érythrocytaire ont un impact fort sur la rhéologie du sang notamment sur la déformabilité érythrocytaire. En effet, une forte concentration en hémoglobine intraérythrocytaire favorise la polymérisation de l'hémoglobine S et ainsi une rigidification du globule rouge (267).

II.1.2.1.3 LA CONCENTRATION EN HEMOGLOBINE

La concentration (sanguine) en hémoglobine (g/dl), donnée par la relation : CCMH x hématocrite, est un facteur important qui donne un indice sur le niveau d'anémie du patient drépanocytaire (de manière plus fiable que l'hématocrite) mais également sur le nombre de transporteurs d'oxygène présents dans son organisme. Cependant, dans le cadre de la drépanocytose, toute l'hémoglobine n'est pas fonctionnelle expliquant en partie la présence d'une hypoxémie au repos (voir partie IV).

Chez les patients drépanocytaires adultes, à l'état de base, comparés à des sujets AA on a : hémoglobine AA (13,7 g/l) > SC (12,2 g/l) > SS (8,2 g/l) (374). Pour l'évolution des valeurs chez l'enfant voir Figure 18. Chez les sujets drépanocytaires de génotype SS, un niveau d'hémoglobine élevé favorise la survenue de crises vaso-occlusives et de syndromes thoraciques aigus (305, 307, 397) ainsi qu'une hypoxémie artérielle (72, 178, 321, 324, 350). La plupart des complications chez les drépanocytaires de génotype SC semblent nettement réduites lors des phlébotomies suggérant qu'un niveau élevé d'hémoglobine est un facteur de risque important chez ces sujets en raison de l'augmentation de la viscosité sanguine (230).



Figure 18. Evolution de la concentration d'hémoglobine ("haemoglobin") en fonction de l'âge chez des enfants AA, SC et SS. D'après (362).

II.1.2.1.4 NUMERATION DES RETICULOCYTES

En hématologie, dans le cadre d'une anémie, la quantité de réticulocytes (globules rouges jeunes, immatures) est un bon indicateur pour savoir si l'anémie est centrale (causée par un défaut de production de globules rouges) ou périphérique (causée par un excès de destruction des globules rouges). En effet, dans le cas d'une anémie périphérique le rein sera en hypoxie et va fabriquer de l'érythropoïétine pour stimuler l'érythropoïèse et ainsi entraîner une augmentation de la concentration de réticulocytes. Dans le cadre de la drépanocytose, nous avons vu que la durée de vie des globules rouges est plus courte, ce qui explique le taux de réticulocytes plus élevé. Il semble que le pourcentage de réticulocytes soit un très bon marqueur d'hémolyse. (169). L'amplitude de l'hémolyse dans la drépanocytose joue un rôle dans un certain nombre de complications comme les accidents vasculaires cérébraux, l'hypertension pulmonaire, les ulcères de jambes et le priapisme (42, 147, 148, 199, 201, 202, 278, 279), mais également l'hypoxémie artérielle (72, 178, 321, 324, 350).

Réticulocytes (%) = (nombre réticulocytes/ nombre de globules rouges) x 100

Du fait du niveau d'hémolyse modéré, les patients SC ont un pourcentage de réticulocytes plus faible. Chez les patients drépanocytaires adultes, à l'état de base, comparés à des sujets AA on a : AA (0,9%) < SC (3,1%) < SS (11,9%) (374). Le niveau d'hémolyse module la fonction vasculaire (148, 199).

II.1.2.1.5 HETEROGENEITE DES ERYTHROCYTES ET DREPANOCYTOSE

Contrairement aux sujets AA, on observe chez les patients drépanocytaires SS une grande hétérogénéité de la densité des globules rouges ce qui est moins le cas chez les individus

SC (Figure 17). Des études sur la séparation des globules rouges par gradient de densité ont permis de mettre en évidence 4 populations d'érythrocytes aux densités différentes :

- une population de faible densité correspondant aux réticulocytes de stress libérés prématurément de la moelle osseuse suite à l'érythropoïèse accrue en réponse à l'anémie hémolytique,
- les discocytes dont les caractéristiques se rapprochent le plus des globules rouges AA,
- Une population de discocytes denses qui sont des globules de forme normale mais dont la densité est plus élevée,
- et une population de densité élevée constituée de drépanocytes irréversibles ayant subi plusieurs cycles de falciformation/défalciformation. Leur demi-vie serait de 2 jours (46).

Chacune de ces populations, en particulier les réticulocytes, par leurs propriétés proadhérentes, et les drépanocytes irréversibles, par leur déformabilité très réduite, joue un rôle important dans la survenue de troubles hémodynamiques et est associée à la survenue d'ulcères de jambes, de priapisme et d'une dysfonction rénale (27). La présence d'érythrocytes denses est associée positivement au niveau d'hémolyse et négativement avec le niveau d'hémoglobine fœtale (27).

II.1.2.2 LES LEUCOCYTES

Les leucocytes sont une famille de cellules comprenant les neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes et monocytes. Les leucocytes, contrairement aux globules rouges, possèdent un noyau et des mitochondries. Le volume de ces cellules est également supérieur à celui d'un globule rouge et varie entre 120 fl pour un lymphocytes à 230 fl pour un monocyte (86). Ces cellules sont lentes à se déformer et à retrouver leur forme. De plus, elles peuvent

adhérer à l'endothélium et ainsi réduire la lumière des vaisseaux. Chez les patients drépanocytaires adultes, à l'état de base, comparés à des sujets AA, le taux de leucocytes varie dans l'ordre suivant : AA ($6,4 \ 10^9/L$) = SC ($7,6 \ 10^9/L$) < SS ($10,9 \ 10^9/L$). Chez les sujets drépanocytaires de génotype SS un nombre élevé de leucocytes, à l'état de base, est un facteur de risque majeur de crises vaso-occlusives, de syndromes thoraciques aigus et d'accident vasculaire cérébral ischémique ou hémorragique (284, 305, 307, 397).

II.1.2.3 LES PLAQUETTES

Les plaquettes sont des éléments de petites tailles en forme de disques de 2-3 µm de diamètre (86). Chez les patients drépanocytaires adultes, à l'état de base, comparés à des sujets AA on a : AA (256 $10^{9}/L$) = SC (311 $10^{9}/L$) < SS (369 $10^{9}/L$). Les plaquettes auraient un impact très faible sur la rhéologie du sang (86) bien gu'elles puissent intervenir dans les phénomènes d'agrégation érythrocytaire en formant des complexes plaquettes-érythrocytes (416). Néanmoins, elles jouent un rôle majeur dans la formation de thrombus, de par leur rôle dans la coagulation. De plus, il a été montré que l'activation plaguettaire contribue à la survenue de crises vaso-occlusives en favorisant l'adhésion érythrocytaire à l'endothélium (14) via une augmentation de la sécrétion de fibrinogène, de facteur de Willebrand (50) et de thrombospondine-1 (56). En effet, la thrombospondine-1 est relarguée par les plaquettes et pourrait se lier aux érythrocytes (c.-à-d. sur CD 36 et la phosphatidylsérine) ce qui permet la fixation des érythrocytes à l'endothélium (c.-à-d. en se fixant sur les facteurs de Willebrand ou les intérgrines αvβ3). Chez les enfants drépanocytaires à l'état de base, le niveau de thrombospondine-1 est plus élevé chez ceux ayant eu un infarctus silencieux que chez ceux n'ayant pas eu d'infarctus cérébral silencieux et est corrélé pour les deux groupes avec la saturation artérielle de l'hémoglobine en oxygène (411).

II.2 LES PARAMETRES HEMORHEOLOGIQUES ET LEURS ALTERATIONS CHEZ LE

PATIENT ATTEINT DE DREPANOCYTOSE.

II.2.1 MECANIQUE DES FLUIDES : CONTRAINTE DE CISAILLEMENT, VITESSE DE

CISAILLEMENT ET VITESSE D'ECOULEMENT

Vitesse d'écoulement, vitesse de cisaillement et contrainte de cisaillement sont trois propriétés qui définissent l'écoulement d'un fluide.

Dans un vaisseau sanguin, l'écoulement d'un fluide peut être schématisé par un modèle constitué d'une multitude de fines couches concentriques emboîtées de façon télescopique. Lors de l'écoulement du fluide, les couches coulissent les unes sur les autres. Il en résulte un frottement entre ces couches, appelé contrainte de cisaillement (τ). Comme nous l'avons abordé dans la partie IV.1.2.3 Hémodynamique et transport d'O2, le cisaillement est provoqué par une différence de pression dans la circulation sanguine générée par le cœur. Ainsi sous l'action du cœur le sang exerce une force de frottement à la surface endothéliale. Cette force se traduit par une contrainte de cisaillement τ à la paroi vasculaire. Les forces de cohésion (forces d'attraction) entre le sang et la paroi du vaisseau sanguin empêchent la couche du plasma, en contact direct avec la paroi, de se déplacer rapidement. Il s'ensuit que, lorsque le sang s'écoule, il doit y avoir une différence de vitesse dans le vaisseau, la vitesse d'écoulement la plus élevée se situant au niveau de l'axe d'un vaisseau cylindrique. Les couches cylindriques successives de sang, se déplacent avec une vitesse de moins en moins grande au fur et à mesure qu'on s'écarte de l'axe central du vaisseau pour se rapprocher de la paroi, au niveau de laquelle la vitesse est très faible. Cette différence de vitesse entre les couches est responsable du gradient de vitesse sanguin (γ) appelé vitesse de cisaillement (Figure 19 et 20). Elle peut être calculée en faisant le rapport de la vitesse du fluide mesurée au centre de la lumière du vaisseau sur le rayon de la lumière du vaisseau :

Vitesse de cisaillement = vitesse au centre (m/s) / rayon (m).

55

La vitesse de cisaillement peut également être calculée à partir de la valeur du débit sanguin :

Vitesse de cisaillement = 4 Q / (π r³)

La vitesse de cisaillement s'exprime donc en s⁻¹. Ainsi, si le rayon de la lumière du vaisseau est faible, la vitesse de cisaillement peut atteindre des valeurs très élevées et ce bien que le débit soit faible (c'est le cas dans les capillaires par exemple).

Pour un débit sanguin donné, la vitesse moyenne du sang dans un vaisseau rectiligne sans bifurcation, soumis à un gradient de pression donné, est déterminée par sa surface de section :

$$V = Q/S$$

où V représente la vitesse moyenne du sang (cm/s), Q, le débit dans le vaisseau (cm³/s) et S, la section orthogonale de ce vaisseau (cm²). Pour un débit volumique donné, la vitesse du sang est d'autant plus grande que le calibre vasculaire est petit. Cela explique notamment pourquoi les vitesses d'écoulement sont plus élevées dans la microcirculation que dans la macrocirculation.



Figure 19. Contrainte de cisaillement (τ), vitesse de cisaillement (γ) et vitesse d'écoulement d'un fluide, dans un vaisseau sanguin, selon que la couche étudiée s'écoule près de la paroi 56

endothéliale (encadré de gauche) ou que la couche étudiée s'écoule près du centre de la lumière du vaisseau (encadré de droite). A noter que les contraintes de cisaillement et vitesses de cisaillement sont plus élevées contre la paroi endothéliale alors même que c'est le lieu où la vitesse d'écoulement est très faible.



Figure 20. Différences de vitesses entre les différentes couches constituant l'échantillon sanguin sur toute la largeur du vaisseau. Les écoulements axiaux sont plus rapides que les déplacements périphériques. Ce type d'écoulement est valable surtout pour les gros vaisseaux ; type « artères », alors que dans la microcirculation, surtout les capillaires, les globules rouges circulent en file indienne. D'après (373).

II.2.2 LA VISCOSITE SANGUINE

La viscosité est un paramètre rhéologique majeur, définie comme la résistance intrinsèque d'un fluide à son écoulement. Elle est la résultante des forces de friction exercées par l'ensemble des constituants du fluide. La viscosité est exprimée quantitativement par le rapport entre la contrainte de cisaillement et la vitesse de cisaillement :

η est appelé coefficient de viscosité et s'exprime en pascal seconde (Pa.s⁻¹) dans le système M.K.S.A et en poise (P) dans le système C.G.S (1 Pa.s⁻¹ = 10 P ; 1 mPa.s⁻¹ = 1 cP). Lorsque le rapport τ / γ reste constant, le fluide satisfait à la loi de Newton. La définition d'un fluide newtonien est assez restrictive : les contraintes de cisaillement sont proportionnelles au gradient de vitesse, ce qui implique que :

- Dans un écoulement de cisaillement simple, les seules contraintes créées par l'écoulement sont des contraintes de cisaillement.
- La viscosité est indépendante de la vitesse de cisaillement.
- La viscosité est indépendante du temps et les contraintes s'annulent immédiatement lorsque l'écoulement est arrêté.

Pour les fluides Newtoniens on parle de viscosité absolue (η) car celle-ci ne dépend ni de la contrainte, ni de la vitesse de cisaillement. Cette viscosité n'est fonction que de la température et de la pression extérieure. En revanche, si le fluide considéré ne satisfait pas aux règles précédemment exposées, on parle alors de fluide non newtonien caractérisé par une viscosité apparente (ou une viscosité dynamique) qui dépend également de la température et de la pression extérieure.

Il existe deux types de liquides non Newtoniens :

- Les fluides rhéofluidifiants, comme le sang, dont la viscosité apparente diminue avec
 l'élévation de la vitesse de cisaillement.
- Les liquides rhéoépaississants dont la viscosité apparente augmente avec l'élévation de la vitesse de cisaillement.

Le sang est donc un fluide non-newtonien rhéofluidifiant. Par ailleurs, le sang possède aussi des propriétés visco-élastiques (il est caractérisé par la présence d'un seuil d'écoulement en dessous duquel il ne s'écoule pas) et thixotropes (la viscosité du sang dépend de l'histoire des contraintes mécaniques qui ont été appliquées sur le sang dans un passé proche) (Figure 21) (90). Ces propriétés biophysiques complexes sont liées notamment à la capacité des globules rouges à s'agréger à faible vitesse de cisaillement et à se déformer à vitesse de cisaillement élevée.



Figure 21. Exemples d'évolution de la viscosité sanguine pour un fluide rhéofluidifiant thixotrope. Pour les conditions A et B, les mesures (•) sont effectuées aux mêmes vitesses de cisaillement. Lorsque les mesures sont effectuées avec une augmentation croissante des vitesses de cisaillement (A), la viscosité est plus élevée que lorsque les mesures sont effectuées avec une diminution croissante des vitesses de cisaillement (B). D'après (373).

Chez les patients drépanocytaires adultes, à l'état de base et pour une vitesse de cisaillement donnée, comparés à des sujets AA on a : viscosité SS < AA < SC. Bien que les sujets SS connaissent de nombreuses anomalies de la rhéologie sanguine (voir plus loin) leur anémie est très marquée ; ce qui explique que leur viscosité sanguine est plus faible que celle des sujets AA. Chez les sujets SC, l'anémie est moins marquée que chez les sujets drépanocytaires homozygotes SS. De plus, les sujets SC sont caractérisés par un certain

nombre de troubles hémorhéologiques (voir plus loin) qui affectent la viscosité. Ceci explique que les sujets SC aient une viscosité sanguine plus élevée que les sujets SS et AA. Chez les patients SS, une augmentation de la viscosité sanguine est un facteur de risque important de crise vaso-occlusive (270). Nous avons récemment confirmé ce résultat dans une population pédiatrique de patients SS (220). D'autre part, Une viscosité sanguine trop élevée serait également à l'origine des ostéonécroses chez les sujets SS et SC (230), bien que jamais vérifiée directement. Et enfin, nous avons également montré très récemment qu'une viscosité sanguine trop élevée était associée à la présence d'une rétinopathie proliférative chez les sujets SC mais pas chez les SS (225).

II.2.3 LES FACTEURS INFLUENÇANT LA VISCOSITE SANGUINE

Nous allons voir que la viscosité sanguine est dépendante de la déformabilité érythrocytaire, de l'agrégation érythrocytaire, l'hématocrite, la viscosité plasmatique, la géométrie du vaisseau considéré et, dans une moindre mesure des propriétés rhéologiques, des globules blancs.

II.2.3.1 LA DEFORMABILITE ERYTHROCYTAIRE

La déformabilité érythrocytaire est un facteur primordial des résistances vasculaires dans la microcirculation où les contraintes de cisaillement et la vitesse de cisaillement sont les plus élevées. En effet, dans les capillaires, le rayon du vaisseau est souvent inférieur à la taille du globule rouge, ce qui demande aux globules rouges de se déformer (parfois de façon extrême comme c'est le cas au niveau des sinus veineux de la rate) pour traverser la microcirculation (Figure 22).

60



Figure 22. Représentation d'un érythrocyte lors de son passage dans un capillaire. L'érythrocyte prend une forme de parachute lors de son passage dans le capillaire.

Par ailleurs, la déformabilité influence la viscosité sanguine totale surtout à vitesse de cisaillement élevé : une déformabilité maximale diminue la viscosité sanguine pour une vitesse de cisaillement donnée. La déformabilité érythrocytaire dépend de 3 facteurs (90):

- la viscosité intra-cytoplasmique. Elle dépend de la concentration cytosolique en hémoglobine (donnée par la CCMH) qui augmente quand les cellules sont déshydratées. Un accroissement de la CCMH de 27 à 37 g/dl multiplie la viscosité cytoplasmique par 3. Nous avons vu que, dans la drépanocytose, la CCMH est augmentée, surtout dans le syndrome drépanocytaire majeur SC. Lorsque l'hémoglobine perd son oxygène, la viscosité intra-cytoplasmique élevée des patients drépanocytaires va précipiter le phénomène de falciformation du globule rouge et donc diminuer sa déformabilité.
- l'excès de surface (~30%) : le GR a un excès de surface par rapport à une sphère de même volume qui lui permet d'adopter une forme en parachute (ou en pantoufle) dans les capillaires les plus fins (Figure 22). Le degré d'hydratation de la cellule influence la relation surface-volume. Si le globule rouge est hyperhydraté, le volume augmente tandis que la surface reste inchangée. Cela contribue à réduire sa déformabilité.

Les propriétés viscoélastiques de la membrane : la membrane érythrocytaire peut tourner librement autour du cytoplasme comme le feraient des chenilles de tank et ainsi, réduire les résistances hydrauliques (347). Ces propriétés visco-élastiques de la membrane sont étroitement liées à l'intégrité du cytosquelette érythrocytaire. La membrane érythrocytaire est composée de protéines implantées dans une bicouche lipidique et d'un réseau protéique sous-membranaire formant le cytosquelette avec pour constituants essentiels la spectrine et l'actine offrant à la membrane sa flexibilité (175). De nombreuses altérations de la déformabilité du globule rouge semblent provenir d'une dégradation des composants de la membrane. Les cycles de falciformation et défalciformation du globule rouge diminuent l'intégrité du cytosquelette et par voie de conséquence sa déformabilité (ainsi que sa durée de vie) (24).

Chez les patients drépanocytaires adultes, à l'état de base, comparés à des sujets adultes de génotypes AA on a : déformabilité globule rouge AA (0,58) > SC (0.42) > SS (0.33) (données obtenues par ecktacytométrie à 30 Pa) (374).

Les altérations importantes de la déformabilité érythrocytaire font partie du schéma physiopathologique des crises vaso-occlusives douloureuses : 1) les érythrocytes plus ou moins déformables entrent dans les capillaires et relarguent leur oxygène vers les tissus; 2) la perte d'oxygène conduit à la polymérisation de l'hémoglobine; 3) la viscosité de l'érythrocyte augmente; 4) la vitesse de l'érythrocyte diminue avec la déformabilitié érythrocytaire; 5) le temps de passage des érythrocytes dans les capillaires est augmenté, aggravant le phénomène de polymérisation; 6) l'érythrocyte quitte la microcirculation ou entraîne une occlusion temporaire ou permanente du vaisseau.

Cependant, cette augmentation de la rigidité ne suffit pas à expliquer l'apparition des phénomènes vaso-occlusifs car il faut prendre en compte la notion de délai de polymérisation. En effet, il a été montré que le délai nécessaire pour que la polymérisation

de l'hémoglobine S ait lieu est généralement supérieur au temps de transit des érythrocytes rigides dans la microcirculation (< 1 seconde) (119, 203). Ainsi pour que la polymérisation de l'hémoglobine S soit possible au niveau de la microcirculation, et donc que le modèle expliqué précédemment soit possible, il faut l'intervention d'un facteur augmentant le temps de transit des globules rouges dans ces territoires désoxygénés (203). Ce facteur est l'adhérence des érythrocytes (*c.-à-d.* en particulier les réticulocytes) et leucocytes à l'endothélium post-capillaire (203). Récemment, nous avons montré que les enfants SS exposés à un risque de crise vaso-occlusive important étaient caractérisés par une déformabilité érythrocytaire supérieure à celle d'enfants SS moins sévères (220). Ce résultat qui pourrait paraître surprenant s'explique par le fait que des globules rouges plus déformables sont également plus adhérents, jouant ainsi un rôle dans l'initiation des crises vaso-occlusives (23).

II.2.3.2 L'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE

L'agrégation érythrocytaire est un facteur primordial des résistances vasculaires dans les zones vasculaires où les vitesses de cisaillement sont nulles ou faibles (ex. veines, veinules) (90). L'agrégation érythrocytaire est un phénomène principalement déterminé par l'agrégabilité érythrocytaire (*c.-à-d.* facteurs cellulaires impliqués dans l'interaction globule rouge-globule rouge) mais également par des facteurs plasmatiques, comme le fibrinogène, protéine de "pontage" entre deux globules rouges (c.-à-d. interaction globule rouge - facteur plasmatique - globule rouge).

Lors du processus d'agrégation, les globules rouges forment des agrégats en 2D, appelés rouleaux, à l'instar d'un empilement de pièce de monnaie ou en 3D (rassemblement de plusieurs rouleaux dans des plans différents) (Figure 23).

63



Figure 23. Représentation d'agrégats érythrocytaires en deux dimensions (1) et en trois dimensions (2).

In vivo, l'agrégation érythrocytaire a lieu à faible vitesse de cisaillement ou lorsque le sang est à l'état de stase. Ainsi, l'agrégation érythrocytaire est le déterminant principal de la viscosité sanguine à faible vitesse de cisaillement (Figure 24) (65). Contrairement aux phénomènes d'agglutination et de coagulation, l'agrégation érythrocytaire est un phénomène réversible. Les agrégats érythrocytaires se forment lorsque les vitesses de cisaillement sont faibles (*c.-à-d.* il s'agit de l'agrégation à proprement parler) et se défont lorsque les contraintes/vitesses de cisaillement augmentent (*c.-à-d.* la désagrégation érythrocytaire). La contrainte/vitesse de cisaillement minimale à partir de laquelle les agrégats érythrocytaires se défont est appelée seuil de désagrégation érythrocytaire (29).

Le processus d'agrégation érythrocytaire peut être considéré comme le résultat de l'équilibre entre forces d'agrégation et de désagrégation. Les forces de désagrégation érythrocytaire incluent :

- les contraintes de cisaillement
- la répulsion électrostatique entre cellules
- l'énergie élastique de la membrane cellulaire.

Les mécanismes exacts impliqués dans l'agrégation érythrocytaire n'ont pas encore été complètement élucidés. Deux théories principales s'affrontent pour expliquer les phénomènes d'agrégation érythrocytaire : le *bridging model* et la *depletion theory* (90, 275). La théorie du *bridging model* est la plus connue et propose que la formation d'agrégats érythrocytaires est possible quand les forces de liaison (ou de pontage), liées à l'absorption de macromolécules à la surface des cellules (comme le fibrinogène), dépassent les forces de désagrégation. Cette théorie est similaire à ce qui se passe dans les phénomènes d'agglutinations si ce n'est que l'absorption des macromolécules crée une liaison plus faible. La *depletion theory* propose quasiment l'inverse : l'agrégation érythrocytaire a lieu lorsque les concentrations protéiques, ou en polymères, proches de la surface cellulaire sont faibles par rapport au milieu de suspension (on parle alors de zone de déplétion relative au niveau de la surface membranaire). Cette zone de déplétion génère un gradient osmotique qui provoque un rapprochement entre les cellules adjacentes (on parle de *depletion interaction*) qui dépasse, là encore, les forces de désagrégation érythrocytaire (39). Cette seconde théorie est plus récente que le *bridging model*.

L'hématocrite (ou la concentration érythrocytaire) et la nature des globules rouges influencent l'agrégation. En effet, dans les régimes d'écoulement à très faible vitesse de cisaillement, l'agrégation érythrocytaire est proportionnelle à l'hématocrite. D'autre part, il a été montré que les globules rouges les plus "âgés", les plus denses, ont une propension plus forte à créer des agrégats que des globules rouges plus jeunes et moins denses (280).

Les valeurs d'agrégation érythrocytaire diffèrent d'une pathologie à l'autre. Dans le cas du diabète, on observe par exemple un état d'hyper-agrégation érythrocytaire qui se normalise avec une amélioration de la glycémie (79). Dans le cadre, de la drépanocytose, chez des patients adultes en état stable, les valeurs d'agrégation érythrocytaire sont plus faibles pour un niveau d'hématocrite et de fibrinogène comparable: AA (60,7%) > SC (50,6%) = SS (53,2%) (Données obtenues par rétrodiffusion laser sur sang normalisé à 40% d'hématocrite, LORCA) (374). Ainsi les globules rouges des patients drépanocytaires agrègent moins vite par rapport à une population contrôle. Ce résultat est surprenant quand on sait que la concentration cellulaire moyenne en hémoglobine est plus importante chez ces patients (voir plus haut). Une explication possible est que la forme des érythrocytes polymérisés de ces patients offre moins de surface de contact pour former des agrégats érythrocytaires (32, 331). Ainsi, le niveau d'agrégation érythrocytaire est lié au niveau de déformabilité érythrocytaire : plus la déformabilité est réduite plus l'agrégation érythrocytaire est faible (32, 331).

Cependant, une fois les agrégats formés, le seuil de désagrégation érythrocytaire est plus élevé chez les patients drépanocytaires : AA (134 s⁻¹) < SC (383 s⁻¹) = SS (315 s⁻¹) (374). Un seuil de désagrégation érythrocytaire élevé peut avoir des conséquences cliniques en augmentant les résistances pré-capillaire suite à une difficulté à rompre les agrégats érythrocytaires (35). Dans ce sens, nous avons montré récemment qu'un seuil de désagrégation élevé est associé à un risque de syndrome thoracique aigu plus important chez les enfants drépanocytaires de génotype SC et SS (220).

Ci-dessous, une figure montrant l'effet des propriétés rhéologiques des globules rouges (déformabilité/agrégation) sur la viscosité sanguine totale.

66



Figure 24 : Effet de la déformabilité et de l'agrégation érythrocytaire sur la viscosité sanguine en fonction de la vitesse de cisaillement. Noir = courbe contrôle, rouge = agrégation érythrocytaire augmentée avec une solution de dextran, violet = déformabilité érythrocytaire diminuée avec du glutaraldéhyde. La partie inférieure de la figure est la mise en correspondance des vitesses de cisaillement et territoires vasculaires où l'on peut trouver des vitesses de cisaillement de cet ordre de grandeur. D'après (90).

II.2.3.3 LA VISCOSITE PLASMATIQUE

Le plasma se comporte comme un fluide newtonien : sa viscosité est constante quelle que soit la vitesse de cisaillement. La viscosité plasmatique est un déterminant majeur de la viscosité sanguine pour deux raisons :

 Toute augmentation de la viscosité plasmatique se répercute proportionnellement sur la viscosité sanguine. La viscosité plasmatique dépend majoritairement de la concentration et de la nature des protéines qui composent le plasma. L'albumine : 67 représente 60% du poids des protéines plasmatiques mais ne contribue qu'à 36% de la différence de viscosité entre le plasma et l'eau. Ceci s'explique par la faible masse moléculaire de l'albumine et sa structure globulaire symétrique. La viscosité plasmatique est, en revanche, très influencée par des molécules asymétriques de formes allongées susceptibles de se placer perpendiculairement à la direction de l'écoulement sanguin. Ainsi, le fibrinogène est responsable pour 22% de la viscosité plasmatique alors qu'il ne représente que 4% du poids des protéines plasmatiques (90). La viscosité normale se situe entre 1,1 et 1,35 mPa.s à 37°C (32, 327). Les patients drépanocytaires, à l'état de base, présentent généralement une viscosité plasmatique normale (données non publiées) ou légèrement supérieure à la normale (78). Il a été montré que la viscosité plasmatique augmentait lors des états de crise vaso-occlusives (17).

 Le plasma contient des protéines, principalement le fibrinogène, qui favorise le phénomène d'agrégation érythrocytaire (327). La quantité de fibrinogène est augmenté lors des états de crise vaso-occlusives (17).

Enfin, nous verrons plus loin que la viscosité plasmatique joue un rôle important sur la régulation du tonus vasomoteur.

II.2.3.4 MIGRATION AXIALE ET VISCOSITE SANGUINE

Il a été montré que le sang circulant dans des tubes dont le diamètre est inférieur à 300 µm (*c.-à-d.* artères de résistances et microcirculation) avait un hématocrite local inférieur à l'hématocrite systémique tel qu'il est mesuré en laboratoire. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet Fahraeus et est la conséquence d'une migration axiale des érythrocytes et de la présence d'une couche de plasma lubrifiante sans érythrocytes d'épaisseur irrégulière contre les parois (127). Cette couche de plasma sans cellule située dans la périphérie du vaisseau est appelée "manchon plasmatique", "cell free layer" ou "plasma layer" (Figure 25).



Figure 25. Représentation du phénomène de migration axiale. RBC core = migration axiale des globules rouges, plasma layer = manchon plasmatique, vascular wall = paroi du vaisseau, muscle tissue = tissue musculaire. D'après (358).

Du fait que la vitesse d'un fluide soit plus importante au centre, (voir plus haut) la migration axiale des globules rouges a pour conséquence que les globules rouges se déplacent plus vite que le plasma contre la paroi des vaisseaux conduisant ainsi à une diminution de l'hématocrite local (86, 127).

D'autre part nous avons vu (partie II.2.1) que la vitesse du sang est donnée par le rapport débit sur section orthogonale du vaisseau. Ainsi plus le calibre du vaisseau diminue, plus la vitesse du sang est importante. En outre, le manchon plasmatique (*c.-à-d.* le cell free layer) crée une couche de glissement, qui réduit l'énergie nécessaire à l'écoulement. Ainsi, du fait de la caractéristique rhéofluidifiante du sang, la viscosité diminue au fur et à mesure que la taille des vaisseaux diminue. Ainsi la viscosité apparente du sang est plus faible dans la microcirculation que dans la macrocirculation : c'est l'effet Fahraeus-Lindqvist (128).

Cependant en dessous d'un diamètre critique, qui dépend de la déformabilité érythrocytaire, le phénomène s'inverse et l'hématocrite ré-augmente, ainsi que la viscosité apparente (112) (Figure 26). En effet, dans les capillaires, les globules rouges circulent en file indienne et le manchon plasmatique à la périphérie est extrêmement fin et ne joue plus son rôle de lubrifiant. Les résistances vasculaires dans les capillaires vont alors dépendre essentiellement de la déformabilité érythrocytaire.



Figure 26. Représentation du phénomène d'inversion de l'effet Fahraeus-Lindqvist. Adapté d'après (112).

L'effet Fahraeus et l'effet Fahraeus-Lindqvist sont absents dans le versant veinulaire car le phénomène de migration axiale des globules rouges dépend fortement de la géométrie vasculaire. En effet, à chaque bifurcation, les globules rouges sont remis en contact avec la paroi endothéliale du fait de collisions intercellulaires (48). Ainsi, le transit du sang dans un segment vasculaire doit être plus long que la période de latence pour que la migration axiale apparaisse. Bishop et collaborateurs ont ainsi montré que la migration axiale dans le réseau veinulaire était de l'ordre de 1% (dans le muscle spinotrapèze du rat pour une veinule de 50

μm de diamètre, la migration axiale apparait sur une longueur de 1 μm alors que la longueur du vaisseau est de 100 μm) (48). *In vivo*, dans le compartiment veinulaire, le phénomène de migration axiale est donc négligeable et se limiterait à la circulation artérielle et en particulier aux artérioles de la microcirculation (424). Nous verrons dans la partie V.2.2 que ce phénomène de migration axiale pourrait être très limité chez les patients drépanocytaires.

II.2.3.5 LEUCOCYTES ET VISCOSITE SANGUINE

Dans les vaisseaux larges, les leucocytes n'ont que peu d'effet sur la viscosité sanguine du fait de leur nombre réduit. Cependant dans la microcirculation, quand les vaisseaux sanguins ont une taille approchant celle du globule rouge, chaque type de cellule est en mesure d'influencer la microcirculation. Le temps de transit des leucocytes dans la microcirculation est plus important que celle des globules rouges du fait de leur taille plus grande et de leur contenu cytoplasmique (présence d'un noyau, mitochondries, etc.) qui les rend moins déformables et également plus lents à se déformer (19). Le taux de leucocytes étant plus élevé chez les drépanocytaires, leur impact sur la viscosité sanguine est sûrement moins négligeable que dans la population générale. D'ailleurs, comme nous l'avons évoqué auparavant, un taux de leucocytes élevé est un facteur de risque pour les accidents vasculaires cérébraux ischémiques et hémorragiques (284) et le syndrome thoracique aigu (305, 307, 397). Enfin, on peut supposer que l'augmentation du nombre de leucocytes pendant les crises vaso-occlusives participe à l'augmentation de la viscosité sanguine.

II.3 CONCLUSION

Nous venons de voir que les patients atteints de la drépanocytose connaissent des altérations hématologiques et hémorhéologiques (voir Tableau 1). D'autre part, ces paramètres hématologiques et hémorhéologiques sont liés chez les patients atteints de la drépanocytose et influencent la viscosité sanguine (Figure 27). Nous verrons dans les parties IV et V que ces paramètres influencent également l'hémodynamique et l'oxygénation sanguine et tissulaire. Enfin, ces altérations hématologiques et hémorhéologiques sont impliquées dans un certain nombre de complications cliniques.
Tableau 1. Comparaison des paramètres hématologiques et hémorhéologiques entre

 sujets AA et patients drépanocytaires de génotype SC et SS à l'état de base

Paramètres hématologiques	
Concentration d'hémoglobine (g/dL)	SS (8,2) < SC (12,2) < AA (13,7)
Hématocrite (%)	SS (25) < SC (34) < AA (42)
Volume cellulaire moyen (fl)	AA (86,2) = SS (84,3) > SC (71,8)
CCMH (g/dL)	AA (33,5) < SS (34,6) < SC (36,5)
TCMH (pg)	AA (29,5) = SS (29,5) > SC (26,2)
Réticulocytes (%)	AA (0.9) < SC (3,1) < SS (11,9)
Leucocytes (10 ⁹ /L)	AA (6,4) = SC (7,6) < SS (10,9)
Plaquettes (10 ⁹ /L)	AA (256) ≤ SC (311) < SS (369)
Fibrinogène (g/L)	AA (3,0) = SC (3,6) = SS (3,0)
Paramètres hémorhéologiques	
Viscosité sanguine à 225 s ⁻¹ (mPa/s)	SC (6,0) > AA (5,1) ≥ SS (4,2)
Viscosité plasmatique (mPa/s)	AA (1,31) = SC (1,34) ≤ SS (1,39)
Déformabilité érythrocytaire (u.a à 30 Pa)	AA (0.58) > SC (0.42) > SS (0.33)
Indice d'agrégation érythrocytaire (%)	AA (60,7) > SC (50,6) = SS (53,2)
Seuil de désagrégation érythrocytaire (s ⁻¹)	AA (134) < SC (383) = SS (315)

CCMH = concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine.



Figure 27. Complexité des interactions entre les paramètres hématologiques et hémorhéologiques. Les mutations β^{S} et β^{C} affectent l'ensemble de ces paramètres (voir tableau 1). Les flèches vertes rendent compte d'une influence importante à faible vitesse de cisaillement et les flèches jaunes à forte vitesse de cisaillement. Les flèches rouges représentent le cercle vicieux de la déshydratation du globule rouge et la flèche violette représente l'effet de la viscosité sanguine sur le débit sanguin, la pression artérielle et les facteurs géométriques vasculaires. La couleur bleu est la couleur par défaut. Ce schéma est généralisable à tout type de population. TCMH = teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine, CCMH = concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, PAM = pression artérielle moyenne, Agreg. Plaq. = agrégation plaquettaire, Agreg et désagreg GR = agrégation et désagrégation érythrocytaire, prot. = protéines, Propr. Membr GR = propriétés de la membrane érythrocytaire, VGM = volume glomérulaire moyen, [Hb] = concentration en hémoglobine, GR = globule rouge, η intra-GR = viscosité intra-érythrocytaire, γ et τ = vitesses et contraintes de cisaillement.

III. MANIFESTATIONS CLINIQUES DE LA DREPANOCYTOSE

Nous nous intéresserons dans cette partie uniquement aux deux syndromes drépanocytaires majeurs (SDM) les plus fréquents : la forme homozygote SS et la forme hétérozygote composite SC.

III.1 SYNDROME DREPANOCYTAIRE MAJEUR SS ET SYNDROME

DREPANOCYTAIRE MAJEUR SC : DEUX PATHOLOGIES DISTINCTES ?

Les études portant sur la forme hétérozygote composite SC sont plus rares que celles portant sur la forme homozygote SS. En outre, dans la plupart des études, la forme hétérozygote composite SC est mélangée, dans l'analyse statistique, avec les données de la forme homozygote SS. Cela s'explique par le fait que la forme hétérozygote composite SC est souvent considérée comme une version moins sévère de la forme homozygote SS (266). Cependant, certains chercheurs estiment qu'il est sans doute plus approprié de considérer la forme hétérozygote composite SC comme une maladie bien distincte de la forme homozygote SS (162, 230).

La pierre angulaire de la forme homozygote SS repose sur la polymérisation de l'hémoglobine S qui conduit à une obstruction des vaisseaux sanguins (voir II.2.3.1), à une réduction de la durée de vie du globule rouge conduisant à un état d'anémie hémolytique chronique, à une vasculopathie diffuse et des dommages aux tissus dans de nombreux organes.

Dans la forme hétérozygote composite SC, les globules rouges contiennent approximativement 45-50% d'hémoglobine S et 40-45% d'hémoglobine C. La gravité de la forme SC vient du fait que l'hémoglobine C favorise la déshydratation du globule rouge et conduit ainsi à l'augmentation de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine et précipite donc la formation de polymère d'HbS (22). Une réhydratation du globule rouge 75 HbSC ramenant la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine à 33 g/dL (*c.-à-d.* au niveau d'un globule rouge HbAA) augmente l'affinité de l'hémoglobine HbSC pour l'oxygène, réduit la viscosité d'une suspension d'HbSC et diminue le taux de falciformation, et permet au globule rouge de reprendre une forme biconcave (ceci n'est pas le cas pour le globule rouge HbSS ou une réhydratation conduit à un globule rouge de forme sphéroïde) (126).

Ces propriétés bien distinctes entre les érythrocytes HbSC et HbSS se traduisent sur le plan clinique par l'existence de complications essentiellement réservées à la forme homozygote SS et d'autres essentiellement ou exclusivement réservées à la forme hétérozygote composite SC (Voir tableau 2 ci-dessous).

Tableau 2. Comparaison de la prévalence des complications cliniques entre sujets

Complications	SC	SS
-	(prévalence en %)	(Prévalence en %)
IMC ≥ 25 Kg/m²	33 (230)	Faible\$
Hypertension artérielle*	14 (230)	54 (152)
Crise vaso-occlusive	~0,4 / année patient (308)	~0,8 /années patients (308)
Syndrome thoracique aigu	20-30 (230, 312)	45-60 (74, 312)
Priapisme	20 (230)	38 - 42 (123, 137)
Splénectomie	0,56 (230)	Quasi totalité (267)
Rétinopathie	70 (230)	43 (113)
Complications otologiques	29 (230)	-
Néphropathie	13 (230)	50,3 - 84 (167, 271)
Hyperfiltration glomérulaire	5	28-40 (167, 271)
Microalbuminurie	5	7 (167)
Macroalbuminurie	2	19-22 (167, 271)
Insuffisance rénale	2	7 (167)
Ostéonécrose	12 (230)	26 (256)
VRT > 2,5 m/sec	4 (230)	30 (147)
VRT > 2,9 m/sec	0 (230)	9 (147)
AVC	1-10 (230, 284)	24 (à 45 ans) (284)
Hypoxémie au repos£	0 (324)	44,2% (324)
Hypoxémie à l'exercice£	?	?
Ulcères de jambes	0.6 (230)	10 (214)
Thromboses	13 (230)	
Nécrose papillaire	4	
Trombo-embolie veineuse	7	
Trombo-embolie artérielle	2	
Espérance de vie	64 (307)	45 (307)

adultes de génotype SC et SS.

IMC = indice de masse corporelle, VRT = vitesse de régurgitation tricuspidienne, AVC = accident vasculaire cérébral. \$ A notre connaissance aucune étude ne s'est véritablement intéressée à la prévalence de l'obésité chez les sujets drépanocytaires adultes de génotype SS. II est cependant connu que l'IMC est plus faible chez l'enfant drépanocytaire SS comparé à des enfants sans pathologie de génotype AA (349). £ L'hypoxémie artérielle au repos est définie par Rackoff et collaborateurs par une saturation transcutanée en oxygène < 96% (324). Concernant la prévalence de l'hypoxémie artérielle induite par l'exercice, aucune étude n'a étudié les patients SS et SC étudiés séparément. *L'hypertension artérielle (HTA) est mal définie dans la drépanocytose car les valeurs de tension artérielle systolique (TAS) et diastolique (TAD) sont généralement inférieures à celles de la population générale (297). La prévalence rapportée chez les sujets SC est basée sur l'étude de Lionnet et

collaborateurs (230) qui définit l'HTA selon les critères suivants : TAS > 130 mmHg et/ou TAD > 80 mmHg. Chez les sujets SS, plusieurs définitions de l'HTA ont été proposées et nous avons retenu celle de Gordeuk et collaborateurs (152) : TAS > 119 mmHg et/ou TAD > 69 mmHg. En prenant les mêmes critères que ceux de Gordeuk et collaborateurs (152) chez les sujets SC, on aurait une prévalence supérieure de l'HTA chez les sujets SC. En effet, ces derniers ont des valeurs de viscosité sanguine plus élevées que les sujets SS, augmentant potentiellement les résistance vasculaires et la pression artérielle.

Au vu du tableau 2, les patients drépanocytaires de génotype SC partagent de nombreuses complications avec les sujets SS avec cependant une incidence souvent moindre. Ainsi les complications aiguës telles que les crises vaso-occlusives, syndromes thoraciques aigus et priapismes ou encore les complications chroniques telles que les rétinopathies, ostéonécroses sont relativement fréquentes dans les deux pathologies.

Cependant, certaines complications telles que l'hypoxémie artérielle au repos, l'hypertension artérielle pulmonaire ou les ulcères de jambes semblent épargner les sujets SC et les néphropathies sont bien moins fréquentes chez ces derniers. Au niveau physiopathologique, ces complications seraient attribuées à l'hémolyse chronique plus marquée chez les sujets SS qui conduit à une vasculopathie dans les différents lits vasculaires (148, 178, 199-201, 321, 324, 350).

D'autre part, les complications otologiques semblent être propres aux sujets SC. De manière surprenante, dans l'étude de Lionnet et coll., 85% des sujets ayant des complications otologiques ont également une rétinopathie (230). L'hypothèse avancée est que ces deux complications seraient liées à l'hyperviscosité sanguine propre aux sujets SC (199). Dans ce sens, nous avons récemment rapporté que la viscosité sanguine des patients SC avec rétinopathie était très largement supérieure à celle des patients SC sans rétinopathie (225).

78

Gladwin & Vichinsky ont proposé un modèle hypothétique dans lequel ils subdivisent la variabilité des complications cliniques en deux sous-phénotypes associés à des mécanismes physiopathologiques distincts (148) (Figure 28). Les auteurs distinguent :

- un sous-phénotype hémolytique : ce phénotype regrouperait tous les patients drépanocytaires qui, à l'état de base, ont une concentration en hémoglobine faible et sont caractérisés par une hémolyse marquée. Les complications rencontrées par les patients de ce sous-phénotype sont l'hypertension artérielle pulmonaire, les ulcères de jambes, le priapisme, les accidents vasculaires cérébraux et l'hypoxémie artérielle. Ces pathologies sont sans doute caractérisées par une vasculopathie résultant d'une dysfonction endothéliale causée par une réduction de la biodisponibilité du NO, un stress oxydant et une prolifération de l'intima et des cellules musculaires lisses, en rapport avec l'hémolyse.
- un sous-phénotype visqueux-vaso-occlusif : ce phénotype regrouperait tous les patients drépanocytaires qui, à l'état de base, ont une concentration importante en hémoglobine et en leucocytes. Ce sous-phénotype est caractérisé par une viscosité sanguine importante et met en jeu une obstruction des capillaires et des veinules post-capillaires par les érythrocytes et les leucocytes. Ce sous-phénotype conduirait à des complications telles que syndromes thoraciques aigus, ostéonécroses, rétinopathies et crises vaso-occlusives douloureuses.



Figure 28. Les patients drépanocytaires pourraient être divisés en deux sous-phénotypes cliniques avec des mécanismes physiopathologiques distincts. Voir texte. Hemolysis = hémolyse, endothelial dysfunction = dysfonction endothéliale, ET-1 = endothéline-1, NO = monoxyde d'azote, Hb = hémoglobine, NOS = nitric oxyde synthase, Arg = arginine, O_2^- = ion superoxyde, VCAM-1 = *vascular-cell adhesion molecule 1*, XO = xanthine oxydase, platelets = plaquettes, post-capillary venule = veinule post-capillaire, decreased NO bioactivity = réduction de la biodisponibilité du NO, increased vaso-occlusion = crises vaso-occlusives augmentées, pulmonary hypertension = hypertension artérielle pulmonaire, leg ulceration = ulcère de jambe, priapism = priapisme, stroke = AVC, pain crisis = crises vaso-occlusive douloureuses, acute chest syndrome = syndrome thoracique aigu, osteonecrosis = ostéonécrose. D'après (148).

Bien que ce modèle hypothétique ait été proposé pour les sujets SS uniquement, il semblerait donc que la plupart des complications propres aux sujets SS soient liées à leur

phénotype hémolytique alors que les complications propres aux sujets SC impliquent l'hyperviscosité sanguine et les phénomènes thrombotiques. Cette hypothèse expliquerait l'efficacité des phlébotomies chez les sujets SC (230). Cependant, cette hypothèse est à nuancer, en effet, nous avons montré récemment qu'une viscosité sanguine élevée était indépendamment associée à un risque de crise vaso-occlusive chez une population d'enfants SS mais pas dans une population d'enfant SC (220). Ce résultat semble s'expliquer par le fait que les enfants SS sont caractérisés par une dysfonction endothéliale contrairement aux enfants SC (données non publiées). L'état de la fonction vasculaire est donc un paramètre important à prendre en compte (voir partie V).

D'autre part, nos récents résultats nous conduisent à une modification du modèle proposé par Gladwin & Vichinsky (148). En effet, Lamarre et collaborateurs montrent qu'un seuil de désagrégation érythrocytaire élevé est indépendamment associé à un risque de syndrome thoracique aigu chez des enfants drépanocytaires SS et SC (220) alors que la viscosité sanguine n'est pas associée à cette complication. Bien que l'ensemble des paramètres hémorhéologiques affecte la viscosité sanguine (*c.-à-d.* aggrégation/désagrégation érythrocytaire, viscosité plasmatique, déformabilité érythrocytaire) ces paramètres ont des impacts différents selon la taille des vaisseaux et les contraintes de cisaillement qui y règnent. Ainsi le sous-phénotype "viscosity, vaso-occlusion" devrait être renommé sous-phénotype hémorhéologique. D'autre part, de récents résultats (non publiés) de notre équipe suggèrent qu'il existe des complications impliquant les mécanismes physiopathologiques des deux sous-phénotypes (100) (Figure 29).



Figure 29. Modifications du schéma de Gladwin proposées par notre équipe. Blood rheological phenotype = phénotype hémorhéologique, renal dysfunction = dysfonction rénale, others = autres. D'après (100).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact des altérations hémorhéogiques sur l'hypoxémie artérielle au repos et à l'exercice (article n°2) ainsi que sur l'oxygénation cérébrale (article n°3). Nous allons donc présenter, ci-dessous plus en détail, la littérature portant sur l'hypoxémie artérielle et les complications cérébrales chez les patients drépanocytaires de génotype SC et SS.

III.2 HYPOXEMIE ARTERIELLE CHEZ LES PATIENTS DREPANOCYTAIRES - LIEN POSSIBLE AVEC LES ALTERATIONS HEMORHEOLOGIQUES ?

De nombreuses études rapportent la présence d'une hypoxémie plus ou moins marquée au repos chez les patients drépanocytaires (49, 72, 88, 136, 234, 235, 257, 273, 321, 324). Comme nous l'avons vu, l'hypoxémie artérielle touche presque exclusivement les patients drépanocytaires de génotype SS et semble toucher plus rarement les patients de génotype SC (324) (Tableau 2). D'autre part, les résultats de saturation artérielle en oxygène varient fortement d'une étude à l'autre et cela est, entre autre, à attribuer à la méthode de mesure employée : oxymétrie de pouls, gaz du sang ou co-oxymétrie (Figure 30). Il est à noter que les mesures les plus fiables sont celles obtenues par co-oxymétrie (c.-à-d. le "gold standard") car elles tiennent compte de la part d'hémoglobine dysfonctionnelle présente (168, 273). Les mesures d'oxymétries de pouls surestiment la saturation artérielle en oxygène car cette technique ne mesure pas la présence d'hémoglobine dysfonctionnelle (168, 273). Enfin, les gaz du sang en plus de ne pas tenir compte de la quantité d'hémoglobine dysfonctionnelle, ne tiennent pas compte des différences dans la courbe de dissociation de l'hémoglobine dans le calcul de la saturation à partir de la PaO₂ (voir partie matériels et méthodes) (168, 273). L'oxymétrie de pouls et surtout les gaz du sang sont donc deux techniques qui surestiment les valeurs réelles de saturation de l'hémoglobine en O₂ (273) (Figure 30). Les mesures d'oxymétrie de pouls ont cependant l'avantage de bien corréler avec les mesures de co-oxymétrie chez les patients atteints de la drépanocytose (r = 0.7, P = 0.002) (273).



Figure 30. Variation du niveau d'hypoxémie artérielle ("Saturation") mesuré chez les patients drépanocytaires selon la technique de mesure employée. SpO₂ = oxymétrie de pouls, SaO₂ = analyse des gaz du sang, FO₂Hb = co-oxymétrie (méthode "gold standard"). D'après (273).

III.2.1 CAUSES DE L'HYPOXEMIE ARTERIELLE CHEZ LES PATIENTS DREPANOCYTAIRES

Plusieurs études reportent que la diminution de la saturation artérielle en O₂ (SpO₂) mesurée par oxymétrie de pouls est souvent présente en l'absence de dysfonction pulmonaire ou de maladie pulmonaire (72, 272, 350). Les facteurs de risque d'une hypoxémie artérielle au repos sont un niveau d'hémoglobine bas (178, 324, 350), une affinité réduite de l'hémoglobine S pour l'oxygène (346) ainsi qu'une hémolyse importante (178, 201, 321, 324, 350). Les mêmes facteurs semblent impliqués lors d'une hypoxémie induite lors d'un test de marche (72). L'implication des mêmes facteurs dans l'hypoxémie de repos et l'hypoxémie induite par l'exercice suggère que les mécanismes physiopathologiques de l'hypoxémie sont amplifiés durant l'exercice.

III.2.2 CONSEQUENCES DE L'HYPOXEMIE

Chez les patients drépanocytaires, l'hypoxémie au repos semble être un facteur de risque pour des complications qui sont classées aussi bien dans :

- le sous-phénotype hémolytique : accident vasculaire cérébral et infarctus cérébral silencieux (206, 323), hypertension pulmonaire (228, 257, 293).
- que dans des complications classées dans le sous-phénotype vaso-occlusif/viscosité
 crises vaso-occlusives douloureuses (165) et syndromes thoraciques aigus (324).

Enfin, il a été montré qu'une chute de plus de 3% de la saturation artérielle en oxygène, lors d'un test de marche (*c.-à-d.* hypoxémie induite par un exercice), prédisait à 29% une vitesse de régurgitation tricuspidienne élevée (72).

L'implication des facteurs hémorhéologiques dans l'hypoxémie au repos et induite par l'exercice n'a jamais été étudiée. Cependant, le fait que l'hypoxémie artérielle soit un facteur de risque dans certaines complications appartenant au deuxième sousphénotype mentionné plus haut, suggère l'implication des altérations hémorhéologiques dans la survenue de cette hypoxémie. De plus, chez les sportifs de haut niveau les paramètres hémorhéologiques semblent jouer un rôle dans la survenue d'une hypoxémie induite par l'exercice (91, 92). Nous traiterons des mécanismes potentiels par lesquels les paramètres hémorhéologiques peuvent conduire à une hypoxémie artérielle dans la partie IV.3. L'étude de l'implication des altérations hémorhéologiques dans la survenue de l'hypoxémie artérielle au repos et à l'exercice a fait l'objet de l'article n°2 présenté dans cette thèse.

III.3 COMPLICATIONS CEREBROVASCULAIRES CHEZ LES PATIENTS

DREPANOCYTAIRES - LIEN POSSIBLE AVEC LES ALTERATIONS

HEMORHEOLOGIQUES?

III.3.1 INCIDENCES DES COMPLICATIONS CEREBROVASCULAIRES

L'incidence des complications cérébrales a été rapportée dans la "Cooperative Study of Sickle Cell Disease" sur plus de 4000 patients (284). Les risques d'avoir un accident vasculaire cérébral (AVC) à 20, 30 et 45 ans sont de 11, 15 et 24% respectivement chez les patients SS, et de 2, 4, 10% respectivement chez les patients SC (284). La figure 31 montre l'évolution des survenus du premier AVC en fonction de l'âge. Chez les sujets SS, la survenue du premier AVC est plus fréquente entre 1 et 9 ans qu'entre 10 et 19 ans (284). Il est à noter que les enfants de génotype SS sont rarement touchés par un AVC avant 2 ans, et rarement avant 9 ans chez les sujets SC (284). Enfin, les sujets SC semblent peu touchés avant l'âge de 40 ans. Ainsi, les mécanismes de survenue d'un AVC pourraient différer entre les SC et SS mais peu d'études ont traité cette question.



Figure 31. Courbe représentant la proportion de sujets drépanocytaires n'ayant pas eu d'AVC en fonction de l'âge. D'après (284).

Parmi les patients SS, enfant et adulte, ayant eu un AVC, 53,9 % étaient de type ischémique, 34,2% étaient hémorragiques, 10,5% étaient des accidents ischémiques transitoires et 1,3% des patients ont eu un accident ischémique et hémorragique. La figure 32 représente la répartition de ces accidents en fonction de l'âge. Il est à remarquer que les accidents ischémiques touchent surtout les patients SS à l'enfance jusqu'à 20 ans et chez l'adulte au-delà de 30 ans. Entre 20 et 30 ans les accidents hémorragiques prédominent (284). Il a été montré que la présence d'une alpha-thalassémie associée à la forme SS diminuait le risque de survenue d'AVC, notamment en raison d'une augmentation du niveau d'hémoglobine (284).



Figure 32. Incidence de la survenue d'un AVC ischémique (ligne continue) ou hémorragique (ligne pointillée) en fonction de l'âge chez les sujets drépanocytaires de génotype SS. D'après (284).

Les facteurs de risques favorisant la survenue d'un AVC ischémique chez les sujets SS enfants et adultes sont la présence d'antécédents d'accidents ischémiques transitoires, un

syndrome thoracique aigu récent, ou un nombre important de syndromes thoraciques aigus depuis plusieurs années, une tension artérielle systolique importante, un niveau d'hémoglobine bas ou un niveau de leucocytes élevé (21, 205, 284). Les facteurs favorisant la survenue d'un AVC hémorragique chez les sujets SS enfants et adultes sont un nombre élevé de leucocytes, un niveau d'hémoglobine bas (284), la présence d'une sténose vasculaire cérébrale ainsi qu'un (ou des) antécédent(s) d'infarctus ischémiques (307). Cependant, le facteur prédictif le plus fiable pour prédire la survenue d'un AVC est une augmentation de la vitesse du flux dans les grosses artères cérébrales (5).

A ce risque d'AVC clinique, il faut ajouter celui des AVC infra-cliniques ou silencieux correspondant à des lésions ischémiques visibles à l'IRM, ne se traduisant pas par des signes neurologiques moteurs ou sensitifs mais pourvoyeurs d'atteintes cognitives (41). Les infarctus silencieux touchent entre 17 et 35% des enfants drépanocytaires sans antécédent d'AVC cliniques (44, 262, 298). Chez l'enfant comme chez l'adulte, les infarctus silencieux, et les AVC en général, sont accompagnés d'un déficit cognitif significatif (15, 398). En outre, les enfants victimes d'AVC ont un quotient intellectuel inférieur de 10 points par rapport aux patients n'ayant eu qu'un infarctus silencieux (15).

Parfois, il est rapporté la présence de nombreux infarctus silencieux au niveau des petits vaisseaux alors que les vaisseaux les plus larges ne présentent aucune anomalie. Cela suggère qu'il pourrait y avoir deux mécanismes distincts conduisant soit à une vasculopathie des grosses artères, soit des petits vaisseaux (55).

Concernant les sténoses progressives, elles touchent surtout le système carotidien à savoir les carotides internes, les cérébrales moyennes et antérieures, aboutissant à l'obstruction et s'accompagnant du développement d'un réseau de collatérales : les réseaux Moya-Moya qui favorisent la survenue d'AVC hémorragiques. Cette sténose progressive est donc responsable des AVC ischémiques et hémorragiques (41).

Enfin les AVC silencieux, caractérisés par une obstruction des petits vaisseaux corticaux et sous-corticaux, sont certainement dus à l'hypoxie et l'effet « *sludge* », c'est à dire le 88

ralentissement et l'agglutinement des drépanocytes dans les petits vaisseaux (voir partie IV.1) (41).

III.3.2 PREVENTION ET PRISE EN CHARGE DES COMPLICATIONS CEREBROVASCULAIRES

De très gros progrès ont été faits concernant la prévention et la prise en charge des complications cérébrovasculaires chez l'enfant drépanocytaire. Ainsi l'incidence de 11% pour les enfants de moins de 18 ans rapportée en 1998 (284) a été réduite à 1,6 % (41, 42). Ce progrès a principalement été permis grâce au dépistage néonatal qui permet un suivi précoce des patients, et à l'arrivée du Doppler Transcranien comme examen de routine chez les enfants drépanocytaires dès l'âge de 2 ans. Le Doppler transcranien est une technique d'échographie qui permet de visualiser les artères intracrâniennes, de vérifier leur perméabilité et de détecter la présence d'une sténose en enregistrant une vitesse élevée de circulation du sang.

Une vitesse importante correspond soit à une réduction de la lumière du vaisseau sans changement de débit, soit à un débit important sans changement important du diamètre de la lumière du vaisseau suite à une anémie profonde et/ou en réponse à une réduction du contenu artériel en O₂. Le paramètre mesuré est la moyenne des vitesses maximales au cours d'un cycle exprimé en mètres par seconde. On mesure ainsi les vitesses dans les 9 grosses artères cérébrales. 4 scénarios sont possibles :

- examen normal: toutes les vitesses sont inférieures à 1,70 m/s
- examen limite: au moins une vitesse est comprise entre 1,70 et 1,99 m/s
- examen pathologique : au moins une vitesse est supérieure ou égale à 2 m/s
- examen incomplet : une ou les deux fenêtres temporales ne sont pas accessibles.

Les vitesses circulatoires intracrâniennes sont plus élevées chez l'enfant drépanocytaire que chez l'enfant et l'adulte non drépanocytaire ; elles sont inversement proportionnelles à

l'hématocrite (393). Elles varient avec l'âge et sont plus hautes entre 3 et 12 ans avec un pic vers 7-8 ans. Ainsi, les critères de sténose utilisés chez l'enfant drépanocytaire sont différents des critères utilisés chez l'adulte (41).

La vitesse de 2 m/s a été choisie suite à l'étude STOP I qui a montré que les vitesses moyennes supérieures à 2 m/s sont prédictives (40%) d'un risque d'AVC dans les 3 ans (7). Lorsqu'une vitesse est supérieure à 2 m/s, l'enfant est mis sous protocole transfusionnel (en attendant de confirmer ce diagnostique par un second doppler puis par une angiographie par résonnance magnétique) (42). L'objectif de la transfusion est de réduire le taux d'hémoglobine S sous le seuil de 30% et de corriger l'anémie (42). Dans l'étude STOP II, la question était de savoir s'il était possible d'arrêter les transfusions (qui comportent des risques en terme de surcharge en fer et allo-immunisation) des enfants ayant eu un doppler transcanien anormal mais dont la vitesse a été normalisée. Il ressort de cette étude que la transfusion ne peut pas être arrêtée en raison d'une augmentation du risque d'AVC (6). Cependant une étude de Bernaudin et collaborateurs a montré qu'il était possible d'arrêter le programme transfusionnel chez les patients dont le doppler s'était normalisé et ayant une angiographie par résonnance magnétique normale sans survenue d'AVC, ni récidive de doppler pathologique en remplaçant les transfusions dans ce cas par l'hydroxycarbamide (43). L'hydroxycarbamide est également donnée aux patients ayant un doppler normal mais une hémoglobine < 7 g/dL (42). Concernant les patients ayant eu un doppler transcranien avec une vitesse comprise entre 1,7 et 2 m/s, il faut observer le niveau d'hémoglobine. Si le niveau d'hémoglobine est inférieur à 8 g/dL le patient est mis sous thérapie transfusionnelle, et s'il est supérieur à 8 g/dL le patient reçoit un doppler tous les 3 mois pour suivi rapproché. Ci-dessous, le protocole de prise en charge des enfants atteints de la drépanocytose en Guadeloupe (Figure 33).



Figure 33. Protocole de prise en charge des complications cérébrales au service de pédiatrie du CHU de Pointe-à-Pitre (schéma réalisé par le docteur Frédérique Maillard). DTC = doppler transcranien, Hb = hémoglobine, Hydrea = Hydroxycarbamide, IRM = imagerie par résonnance magnétique. Trsf = transfusion, trsf Obj Hb > 8 g/dL = transfusion avec pour objectif de passer au-dessus des 8 g/dL, patho = pathologique, CAT = conduite à suivre, PEC = prise en charge.

La vitesse du flux sanguin est donc un paramètre important chez les enfants drépanocytaires (N.B chez l'adulte également mais les études manquent pour caractériser une vitesse du flux pathologique (383)). En outre, il a été montré qu'une augmentation du débit sanguin chez l'enfant (et cela bien avant qu'une vitesse du flux sanguin pathologique soit observée au doppler transcranien) était à l'origine d'un retard cognitif (364). Or, il a été montré que le niveau de saturation en oxygène dans la microcirculation cérébrale influence le débit sanguin par le biais d'une vasodilatation des vaisseaux (57) (voir partie IV.2). Une baisse de la saturation en oxygène dans la microcirculation cérébrale pourrait donc être le facteur primaire à l'origine des

complications cérébrales chez les enfants comme chez les adultes atteints de la drépanocytose.

III.3.3 SATURATION EN OXYGENE DE LA MICROCIRCULATION CEREBRALE CHEZ LES

PATIENTS DREPANOCYTAIRES

Il a été montré chez les patients drépanocytaires, adultes et enfants, n'ayant eu aucun antécédent d'accident vasculaire cérébral, que la saturation en oxygène de la microcirculation cérébrale est réduite comparée à celle d'un groupe contrôle (269, 326). Les auteurs de ces études suggèrent que cette réduction de la saturation pourrait rendre compte d'une hypoxie cérébrale. Cependant, deux études antérieures semblent montrer que la consommation cérébrale d'oxygène n'est que faiblement réduite chez les patients drépanocytaires SS adultes (171, 173). Les auteurs de ces études montrent que la consommation d'oxygène au niveau cérébral est conservée par le biais d'une augmentation du débit sanguin cérébral (Figure 34) suite à une diminution du contenu artériel en oxygène (171, 173). En effet, une transfusion sanguine permet de normaliser la vitesse du flux sanguin (171, 318). Ainsi une diminution de la saturation en oxygène de la microcirculation cérébrale est à l'origine d'une augmentation du flux sanguin par le biais d'une vasodilatation importante qui perdure dans le temps. Cet état de vasodilatation chronique est à l'origine d'une diminution de la réserve cérébrovasculaire (281) et peut expliquer la prévalence des accidents ischémiques dans la population drépanocytaire alors plus sensible à une chute du niveau d'hémoglobine ou de la pression de perfusion cérébrale.



Figure 34. La consommation d'oxygène par le tissu cérébral (CMRO₂ et OER) chez les patients drépanocytaires est maintenue normale par une augmentation du débit sanguin (CBF). CBF/CBV représente le ratio entre débit sanguin/volume sanguin ; il s'agit d'un indice de la pression de perfusion cérébrale. N = sujets contrôle, S = sujets drépanocytaires SS. D'après (171, 173).

De manière surprenante, il semblerait que la saturation en oxygène réduite de la microcirculation cérébrale ne soit pas liée au niveau d'anémie, du moins chez des patients drépanocytaires à l'état de base (269, 326). En effet, Nahavandi et collaborateurs montrent que pour un même niveau d'hémoglobine, des sujets anémiés non SS (AA) ont une saturation qui reste supérieure à celle des sujets drépanocytaires de génotype SS (Figure 35) (269). Il se pourrait que cette différence de saturation entre sujets anémiés AA et sujets drépanocytaires SS soit liée à une affinité de l'hémoglobine S plus faible pour l'oxygène que l'hémoglobine A (4, 346) En effet, une plus faible affinité de l'hémoglobine S pour l'oxygène favoriserait le relargage d'oxygène au niveau des tissus. L'autre hypothèse, jamais testée mais qui peut être avancée, est la contribution des altérations de la rhéologie sanguine, de par leur effet sur le transport de l'oxygène, l'oxygénation tissulaire et la fonction vasculaire (voir parties V). D'ailleurs, il a été montré que la saturation en

oxygène de la microcirculation cérébrale était augmentée après une transfusion sanguine (326) mais également après un traitement prolongé à l'hydroxyurée (368) : deux traitements qui améliorent nettement la rhéologie sanguine des patients drépanocytaires.

Cette hypothèse a fait l'objet de l'article n°3. Nous avons mesuré, les paramètres hématologiques et hémorhéologiques ainsi que la saturation en oxygène de l'hémoglobine au niveau de la microcirculation cérébrale chez 21 sujets SS, 21 sujets SC et 20 sujets contrôle AA n'ayant eu aucun antécédent de complications cérébrovasculaires. Nous avons ensuite testé si les paramètres hématologiques et hémorhéologiques étaient corrélés au niveau de saturation en oxygène de la microcirculation cérébrale. Enfin, nous avons également testé, chez ces sujets asymptomatiques, la présence du phénomène de compensation qu'est le vasomotion (voir partie IV).



Figure 35. La saturation en oxygène de la microcirculation cérébrale (rSO2%) est plus faible chez des sujets drépanocytaires SS (HbS) comparée à celle des sujets anémiés de génotype AA (HbA) et ce pour un niveau d'anémie comparable (Hb). D'après (269).

Ainsi, dans ce chapitre nous avons vu que les mutations β^{s} et β^{c} conduisent à des anomalies du globule rouge. Ces anomalies du globule rouge sont à l'origine d'altérations hématologiques et hémorhéologiques. D'autre part, il semble également que les formes SS et SC divergent quand à la prévalence et à la nature des complications soulignant le fait qu'il s'agit, finalement, de deux pathologies relativement distinctes. Enfin, il est à noter que les complications dont nous avons traité affectent l'oxygénation sanguine et tissulaire.

Nous avons uniquement traité dans cette partie clinique de l'hypoxémie et de l'oxygénation tissulaire cérébrale. Cependant, les altérations hématologiques/hémorhéologiques, ainsi que la présence d'une hypoxémie artérielle pourraient également altérer l'oxygénation musculaire. Aucune étude, à notre connaissance, ne s'est véritablement intéressée à cette question, si ce n'est Callahan et collaborateurs, qui suggèrent que chez certains patients drépanocytaires les aptitudes aérobies seraient limitées par une myopathie (71).

C'est pourquoi, dans l'étude n°4, nous avons voulu tester le niveau de VO₂ musculaire au repos et la fatigabilité musculaire chez le sujet drépanocytaire. Cette étude a été réalisée avec la même population que pour l'étude n°3. Les paramètres cliniques, hématologiques et hémorhéologiques ont été mesurés ainsi que le débit sanguin musculaire et la VO₂ musculaire. L'objectif principal était de tester si la VO₂ musculaire était réduite chez les patients drépanocytaires et si les paramètres que sont le débit sanguin musculaire, la saturation artérielle en oxygène ainsi que les paramètres hématologiques/hémorhéologiques étaient associés à ce niveau de VO₂ musculaire. Enfin, les sujets ont également réalisé un exercice intermittent de "Handgrip" sur une période d'une minute pour observer si la fatigabilité musculaire est plus importante chez des patients drépanocytaires par rapport à un groupe contrôle.

95

IV. TRANSPORT DE L'OXYGENE ET REGULATION DE

L'OXYGENATION TISSULAIRE

La drépanocytose est une maladie qui affecte l'oxygénation tissulaire. Dans cette partie nous allons donc traiter des mécanismes de transport de l'oxygène ainsi que des mécanismes de régulation de ce transport.

Le transport de l'oxygène se fait par le biais du système respiratoire, du système cardiovasculaire et des globules rouges chargés du transport de l'oxygène. Le système respiratoire permet de transporter l'oxygène contenu dans l'atmosphère vers les alvéoles pulmonaires. Il s'ensuit une diffusion de l'oxygène contenu dans les alvéoles vers le sang circulant à travers les capillaires pulmonaires. Le système cardiovasculaire permet, quant à lui, le transport des globules rouges oxygénés aux différents organes par convection. L'oxygène est ensuite relâché par l'hémoglobine vers les cellules parenchymateuses des différents tissus par diffusion passive. Enfin, l'oxygène qui a diffusé dans les cellules est utilisé par les mitochondries (en présence d'équivalents réducteurs) afin de produire de l'adénosine trisphosphate (ATP). Les mitochondries sont capables de produire de l'ATP jusqu'à ce que la tension en oxygène (PO₂) dans leur voisinage atteigne le niveau critique de 1 mmHg (304). Il est donc important pour les systèmes cardiorespiratoires de maintenir ce seuil critique. La régulation de l'oxygénation tissulaire est donc un enjeu pour la survie de l'organisme.

IV.1 TRANSPORT DE L'OXYGENE

IV.1.1 TRANSPORT DE L'OXYGENE PAR LE SYSTEME RESPIRATOIRE

La principale fonction du système respiratoire est de fournir de l'oxygène (O₂) à l'organisme et d'éliminer le dioxyde de carbone (CO₂). La respiration pulmonaire comprend deux étapes qui sont la ventilation pulmonaire et la diffusion alvéolo-capillaire. Ces étapes permettent 96 d'amener l' O_2 présent dans l'atmosphère au sang contenu dans les capillaires pulmonaires. Le transport de l' O_2 de l'atmosphère vers le sang se fait par diffusion de l' O_2 d'une zone de haute pression partielle en O_2 (l'atmosphère) vers une zone de plus basse pression partielle (le sang des capillaires pulmonaires). Enfin la solubilité du gaz dans le sang ainsi que le poids moléculaire de l'oxygène influence également son transport vers le sang.

IV.1.2 TRANSPORT D'OXYGENE PAR LE SYSTEME CARDIOVASCULAIRE

L'O₂ dissous dans le sang ne représente qu'une faible partie de la concentration totale d'oxygène présente (~1.5%) du fait de sa faible solubilité dans l'eau. Si l'O₂ ne pouvait être transporté que sous sa forme dissoute, il faudrait une pression partielle en O₂ et/ou un débit cardiaque bien plus élevé pour la survie de l'organisme au repos. En outre, la diffusion passive est un processus chimique efficace mais uniquement sur de courtes distances (100 μ m). Les organismes les plus grands n'ont donc pu se développer qu'en assurant la circulation d'un liquide contenant de l'oxygène à proximité de chaque cellule. Ainsi, comme nous allons le voir, les érythrocytes jouent un rôle majeur dans le transport de l'O₂ dans l'organisme. Ce transport se fait par un mécanisme de convection où le cœur est le moteur permettant de maintenir un gradient de pression permettant l'écoulement sanguin et par conséquent le transport des gaz.

IV.1.2.1 GLOBULE ROUGE/HEMOGLOBINE ET TRANSPORT D'OXYGENE

Nous avons déjà présenté succinctement la molécule d'hémoglobine (et ses différentes formes) dans la partie I.1.2. La capacité du sang à transporter de l'O₂ est considérablement augmentée par la présence d'hémoglobine (Hb) responsable de 98,5% du transport d'O₂. Chaque molécule d'hémoglobine peut transporter 4 molécules d'O₂ soit 1,39 ml d'O₂ par gramme d'hémoglobine. Le terme de déoxyhémoglobine (HHb) désigne la molécule d'hémoglobine non oxygénée et le terme d'oxyhémoglobine (HbO₂) désigne la molécule 97

lorsqu'elle porte de l'O₂. La liaison et la dissociation de l'O₂ sont exprimées par l'équation suivante :

$$HHb + O_2 = HbO_2 + H^{\dagger}$$

Les porphyrines lorsqu'elles sont isolées fixent l'oxygène de façon irréversible, mais leur localisation dans le creux de la sous-unité (α ou non- α) n'autorise qu'une liaison plus faible avec l'O₂ et donc facilement réversible. Lorsque l'O₂ se fixe sur l'un des 4 monomères, la protéine d'hémoglobine change de conformation. Le changement de conformation d'une sous-unité α favorise ainsi l'accueil d'une molécule d'O₂ par une sous-unité non- α . Ce changement de configuration est appelé transition allostérique. Le processus d'oxygénation ou de désoxygénation de l'hémoglobine ne nécessite que quelques millisecondes. La vitesse à laquelle l'hémoglobine capte ou libère l'oxygène dépend de plusieurs facteurs : les pressions partielles de l'O₂ et du CO₂, la température, le pH sanguin et la concentration de 2,3-DPG dans les érythrocytes. L'interaction de ces facteurs assure aux cellules un approvisionnement suffisant en O₂. On estime qu'au repos 0,25 s suffit pour oxygéner l'hémoglobine contenue dans les érythrocytes soit ~1/3 de la durée du transit des érythrocytes dans les capillaires pulmonaires (184).

Influence de la PO_2 sur la saturation de l'hemoglobine

En raison de la transition allostérique que nous venons de décrire, la relation entre la quantité d' O_2 liée à l'hémoglobine (% de saturation de l'hémoglobine) et la PO_2 sanguine n'est pas linéaire. La courbe de dissociation de l'hémoglobine en fonction de la PO_2 a une forme de « S » (Figure 36). Dans le cas de l'hémoglobine A, la pente est abrupte entre 10 et 50 mmHg, puis elle forme un plateau entre 70 et 100 mmHg.



Figure 36. Courbe de dissociation de l'hémoglobine. D'après (243).

Comme nous allons le voir la PO₂ n'indique que la quantité d'O₂ dissoute dans le plasma, et non pas la quantité liée à l'hémoglobine. Toutefois, les mesures de la PO₂ fournissent de bons indices de la fonction pulmonaire, et une PO₂ dans le sang artériel très inférieure à la PO₂ alvéolaire reflète une hypoxémie.

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE, DU PH, DE LA PCO₂ ET DU 2,3-DPG SUR LA

SATURATION DE L'HEMOGLOBINE

La température, le pH, la PCO₂ ainsi que la concentration de 2,3-DPG (2,3diphosphoglycérate) influent sur la saturation de l'hémoglobine en modifiant sa structure tridimensionnelle et, par conséquent, son affinité pour l'oxygène définie par la P50. Le 2,3-DPG est un composé unique qui forme des liaisons réversibles avec l'hémoglobine. Il est produit par les érythrocytes au moment de la glycolyse (dégradation du glucose). En règle générale, une augmentation de la température, de la PCO₂, de la concentration sanguine d'ions H⁺ (donc baisse du pH – effet Bohr) ou des taux sanguins de 2,3-DPG réduit l'affinité de l'hémoglobine pour l'O₂ et entraîne un déplacement vers la droite de la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine, ce qui favorise la dissociation de l'oxygène du sang (*c.-à-d.* augmentation de la P50). Inversement, une diminution de l'un de ces facteurs accroît l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène et entraîne un déplacement de la courbe de dissociation de l'hémoglobine pour l'oxygène et entraîne un déplacement de la courbe de dissociation de l'hémoglobine pour l'oxygène et entraîne un déplacement de la courbe de dissociation de l'HbO₂ vers la gauche (*c.-à-d.* diminution de la P50) (Figure 37).



Figure 37. Effet de la température, de la pression partielle du CO₂ (PCO₂) et du pH sanguin sur la courbe de dissociation de l'hémoglobine. La dissociation de l'oxygène est accélérée par l'élévation de la température (a), l'augmentation de la PCO₂ et/ou la diminution du pH (b) ce qui décale la courbe de dissociation de l'hémoglobine vers la droite. D'après (243).

IV.1.2.2 HEMODYNAMIQUE ET TRANSPORT D'O2

Pour que le sang circule à travers un vaisseau, un organe ou la circulation systémique dans son ensemble, il faut qu'il y ait une différence de pression (ΔP) entre l'entrée et la sortie du réseau sanguin. Dans le cas du système cardiovasculaire, ΔP est représenté par la pression artérielle moyenne (PAM). Le débit sanguin (Qc) est ainsi donné par la loi d'Ohm :

$$Qc = PAM / R(1)$$

où R est la résistance périphérique de l'écoulement du sang. La ΔP moyenne dans les vaisseaux est donnée par la relation :

où la pression pulsée est la différence entre la pression systolique et la pression diastolique. On remarque que le débit sanguin dépend à la fois du différentiel de pression généré par le cœur et des résistances périphériques à l'écoulement.

La résistance périphérique R peut également être exprimée ainsi :

R = géométrie des vaisseaux multipliée par la viscosité sanguine (η) (2)

D'autre part, la loi de Poiseuille (1846) a décrit le débit sanguin dans un vaisseau en prenant dans son modèle un tube en verre cylindrique, les propriétés géométriques du tube et les propriétés d'écoulement du sang (310). D'après la relation de Poiseuille on a :

$$Q_{c} = \pi r^{4} \Delta P / 8 \eta L(3)$$

102

Où Q_c représente le débit sanguin, r le rayon du cylindre, L la longueur du tube, ΔP la différence de pression entre les extrémités du tube (soit PAM pour le système cardiovasculaire).

A partir de (2) et (3) il devient possible d'exprimer les résistances en séparant les facteurs géométriques de la viscosité sanguine, on obtient :

R = [(8L)/(πxr⁴)] x η Soit R = Géométrie vasculaire x η (4)

Il est à noter ici que les résistances vasculaires sont plus dépendantes des facteurs géométriques (majoritairement le rayon des vaisseaux sanguins) que de la viscosité sanguine du fait que le rayon est élevé à la puissance 4. Cependant nous verrons dans la partie V, que la viscosité sanguine a une influence importante sur le rayon des vaisseaux sanguins (*c.-à-d.* vasomotricité) et que par conséquent, les aspects vasculaires et hémorhéologiques ne devraient pas être traités comme des entités à part dans la modulation des résistances vasculaires. Bien que la loi de Poiseuille soit pratique pour comprendre la physiologie cardiovasculaire, il est important de mentionner quelques limites : 1) elle a été validée pour des tubes rigides et non pour un système vasculaire dynamique qui à tout moment va être modulé par des facteurs intrinsèques et extrinsèques ; 2) elle devrait s'appliquer normalement uniquement pour des fluides newtoniens, ce qui n'est pas le cas du sang puisque la viscosité peut prendre des valeurs différentes d'un compartiment vasculaire à un autre ou en fonction des situations (exercice physique par exemple) (89, 154, 341).

103

IV.1.2.4 Relation entre pression partielle en O_2 (PO₂), saturation arterielle en O_2 (SaO₂), Contenu arteriel en O_2 (CaO₂), transport arteriel de l'O₂ (TaO₂) et consommation d'oxygene

Il est possible de déterminer le contenu artériel en O₂ (CaO₂), présent à chaque instant dans le système cardiovasculaire, par la relation suivante :

où [Hb] représente la concentration d'hémoglobine (g/L), 1.39 le volume d'O₂ (en mL) transporté par 1 gramme d'hémoglobine, PaO_2 représente la pression partielle artérielle en O_2 et 0.03 le coefficient de solubilité de l'O₂ (loi de Henry).

Idéalement, il faudrait connaître le transport artériel de l' O_2 (Ta O_2), soit la quantité d' O_2 transportée par minute :

D'après (1), (2), (3) et (4) (voir partie précédente IV.1.2.2) on obtient :

Afin de permettre la survie de l'organisme la TaO_2 doit être en adéquation avec la consommation d'oxygène (VO₂). Ainsi, il est possible de voir que la PAM, SaO₂, la géométrie vasculaire (principalement le rayon de la lumière du vaisseau) ainsi que la viscosité sanguine sont des facteurs importants intervenant dans le transport d'oxygène et que la PaO₂ semble

être un facteur négligeable. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment la SaO₂ est très dépendante de la PaO₂.

IV.1.3 COUPLAGE CARDIORESPIRATOIRE ET HYPOXEMIE ARTERIELLE

Pour que le transport d'oxygène des poumons vers la circulation sanguine soit efficace, il doit y avoir un couplage entre la ventilation alvéolaire et la perfusion artérielle pulmonaire ainsi qu'une diffusion optimale de l'oxygène des alvéoles vers l'hémoglobine contenue dans les érythrocytes. L'altération de ces mécanismes conduit à l'hypoxémie artérielle. L'hypoxémie artérielle peut être observée au repos et à l'exercice. Nous présentons ici les données portant sur l'hypoxémie artérielle à l'exercice chez le sportif du fait de la quasi absence d'étude (c.-à-d. une seule : (72)) chez les patients drépanocytaires.

IV.1.3.1 HYPOXEMIE ARTERIELLE AU REPOS

L'hypoxémie artérielle au repos est définie comme une saturation artérielle en oxygène sousmaximale (*c.-à-d.* SaO₂ < 100%). L'hypoxémie artérielle au repos, observée au niveau de la mer est pathologique et est causée par la présence d'un gradient trop important de tension alvéolo-capillaire en oxygène (A-aPO₂). L'augmentation de la A-aPO2 peut être causée par la présence d'un découplage du ratio débit alvéolaire (VA)/débit sanguin pulmonaire (Q), une limitation de la diffusion alvéolo-capillaire en oxygène ainsi que par la présence de shunts anatomiques ou physiologiques entre la circulation pulmonaire et artérielle (184).

IV.1.3.1.1 DECOUPLAGE DU RATIO VA/Q

Le découplage du ratio VA/Q peut être causé par une inhomogénéité de la ventilation et une inhomogénéité de la perfusion sanguine.

Une diminution de la PO₂ dans certaines alvéoles conduit à une constriction des artérioles pulmonaires qui desservent ces alvéoles et le sang est dirigé vers d'autres zones de la membrane alvéolo-capillaire ; inversement, une augmentation de la PO₂ dans ces alvéoles conduit à la vasodilatation des artérioles pulmonaires qui les desservent. A noter que le mécanisme de régulation qui commande aux muscles lisses des artérioles pulmonaires est l'inverse de celui qui régit la plupart des artérioles de la circulation systémique (Figure 38).



Figure 38. Mécanisme du couplage ventilation perfusion. D'après (243).

IV.1.3.1.2 LIMITATION DE LA CAPACITE DE DIFFUSION ALVEOLO-CAPILLAIRE DE L'OXYGENE

D'après la loi de diffusion de Fick la quantité de gaz diffusée par unité ($T_{diffusion}$) de temps à travers une membrane d'épaisseur Δx est proportionnelle à l'Aire d'échange disponible (A) et à la différence de pression partielle (ΔP) du gaz de part et d'autre de la membrane. On a donc :

$$T_{diffusion} = KA \Delta P / \Delta x$$

K représente le coefficient de diffusion de Krogh. Concernant les échanges gazeux entre les alvéoles et les capillaires, A et Δx sont identiques pour tous les gaz. La différence du taux de diffusion entre chaque gaz dépend donc des différences de K et de ΔP .

La vitesse de diffusion est donc influencée, pour une pression partielle donnée, par l'aire de la surface alvéolo-capillaire disponible pour les échanges et l'épaisseur de la membrane alvéolo-capillaire. Cependant, ceci n'est qu'une approximation car les résistances pulmonaires à la diffusion de l'oxygène vers l'hémoglobine érythrocytaire ne se limitent pas à l'épaisseur de la membrane alvéolo-capillaire. Elles dépendent également de l'homogénéité de la distribution de la ventilation dans les acini pulmonaires (*c.-à-d.* l'acinus est l'unité morphofonctionnelle du parenchyme respiratoire - Figure 39), des résistances liées à l'épaisseur de la membrane alvéolo-capillaire et du plasma et des résistances liées à la diffusion de l'O₂ à travers les membranes érythrocytaires et à la liaison chimique avec l'hémoglobine (184). Nous allons voir que les paramètres hématologiques/hémorhéologiques ont un impact sur le passage de l'O₂ au niveau de la barrière alvéolo-capillaire, de la membrane érythrocytaire et de la liaison chimique O₂-hémoglobine.



Figure 39. Représentation de la structure d'un acinus pulmonaire. D'après (1).

ROLE DE LA DENSITE ET DE LA REPARTITION SPATIALE DES ERYTHROCYTES DANS LES

CAPACITES DE DIFFUSION PULMONAIRE DE L'OXYGENE

Hsia et collaborateurs ont montré qu'une élévation de l'hématocrite favorisait la diffusion de l'O₂ (183). Dans ce sens Franck et collaborateurs ont montré que la capacité de diffusion pulmonaire de l'oxygène s'accroit avec l'augmentation de l'hématocrite pour atteindre un plateau vers 35% (141). Ces données suggèrent qu'il existe un hématocrite optimal pour la diffusion de l'oxygène au niveau pulmonaire. Les auteurs suggèrent que l'existence d'un plateau pourrait s'expliquer par une compétition entre globules rouges lors du captage de l'oxygène (141).

D'autre part, Hsia et collaborateurs montrent que pour un hématocrite donné, une répartition homogène des érythrocytes améliore la diffusion de l'oxygène lorsque les résultats sont comparés à une répartition non homogène à l'intérieur d'un même capillaire pulmonaire
(183) (Figure 40). Il se pourrait donc qu'une réduction de la déformabilité érythrocytaire participe à une répartition non homogène des érythrocytes.



Figure 40. Relation entre la capacité de diffusion pulmonaire de l'oxygène ("total DLCO"), le nombre d'érythrocytes dans un même capillaire ("No. of RBCs") et la répartition spatiale des érythrocytes dans ce capillaire. Uniform = répartition uniforme des érythrocytes (placés à équidistance au sein du capillaire), clustered = répartition non uniforme des érythrocytes au sein du capillaire. A noter que la diffusion pulmonaire de l'oxygène est améliorée par une répartition homogène des érythrocytes au sein d'un capillaire pour un hématocrite donné. D'après (183).

RESISTANCE PULMONAIRE A LA DIFFUSION DE L'OXYGENE ET DIFFICULTE LIAISON DE

L'OXYGENE A L'HEMOGLOBINE

Seule une partie limitée de la membrane érythrocytaire est proche de l'endothélium capillaire et est donc utilisée de manière optimale dans le mécanisme de diffusion. Cependant, lorsque les contraintes de cisaillement sont importantes (ce qui est le cas dans la microcirculation pulmonaire), les érythrocytes se déforment et il apparaît un phénomène dit de "tank-treading motion" de la membrane (135). Le "tank-treading motion" est défini comme la rotation de la membrane érythrocytaire autour du cytoplasme. Ce mécanisme permet de mettre en mouvement l'hémoglobine intra-érythrocytaire et réduit ainsi les résistances à la diffusion de l'oxygène vers l'hémoglobine en diminuant la distance oxygène-hémoglobine. Une diminution de la déformabilité érythrocytaire altère ce phénomène de tank-treading motion. Ainsi une diminution de la déformabilité érythrocytaire pourrait augmenter les résistances à la diffusion de l'oxygène.

Enfin, une diminution de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène (*c.-à-d.* augmentation de la P50) participe également à une augmentation des résistances à la diffusion de l'oxygène (182).

IV.1.3.1.3 HYPOXEMIE DE REPOS ET SHUNTS PHYSIOLOGIQUES

En l'absence de pathologies la présence de shunts physiologiques est relativement négligeable (188, 402). Cependant, la présence de shunt physiologique peut être causée par une diminution de la déformabilité érythrocytaire. En effet, Parthasarathi et collaborateurs ont montré qu'une déformabilité érythrocytaire réduite conduit les érythrocytes peu déformables à se diriger vers les conduits les plus larges (292).

IV.1.3.2 HYPOXEMIE ARTERIELLE INDUITE PAR L'EXERCICE (HIE) ET IMPLICATIONS DES

PROPRIETES HEMORHEOLOGIQUES CHEZ LE SPORTIF

L'hypoxémie induite par l'exercice (HIE) est définie par une chute artérielle en oxygène (SaO₂) supérieure ou égale à 3-4 % par rapport aux valeurs de repos quand la consommation maximale d'oxygène est atteinte (VO_{2max}) (109, 315). La moitié des sportifs, pratiquant une activité d'endurance et ayant une aptitude physique aérobie élevée (consommation d'oxygène maximale VO_{2max} \geq 55 ml.kg⁻¹.min⁻¹), présentent une HIE (313).

Lors d'une augmentation du volume courant durant l'exercice, l'inflation des poumons entraîne un déploiement et/ou un étirement de la surface épithéliale des alvéoles (18) ce qui participe à une augmentation de 20% de la capacité de diffusion alvéolo-capillaire en oxygène entre le repos et la VO_{2max} (255).

Cependant, entre le repos et la VO_{2max} , le débit sanguin pulmonaire (Q) augmente plus que la capacité de diffusion alvéolo-capillaire de l'oxygène (DL). Chez les athlètes de haut niveau le ratio (DL)/(Q) diminue assez pour affecter la saturation artérielle en oxygène (184). En somme le débit sanguin pulmonaire dépasse les capacités de diffusion alvéolo-capillaire et le temps de passage des érythrocytes dans la microcirculation pulmonaire est trop court pour une oxygénation complète de l'hémoglobine (184) (Figure 41). Ce phénomène s'explique donc par une limitation de la fonction pulmonaire par rapport à la fonction cardiaque.



Figure 41. A gauche : Relation entre le ratio capacité de diffusion alvéolo-capillaire de l'oxygène/débit sanguin pulmonaire (ratio DL/Q ou "DL_{CO} per liter pulmonary blood flow") et saturation en oxygène à la sortie du capillaire ("End-capillary O₂ saturation"). L'hypoxémie n'apparaît que chez les athlètes de haut niveau ("Maximal exercise athlete"). A droite : Relation entre le temps de transit des érythrocytes dans les capillaires pulmonaires ("transit time") et le niveau de saturation de l'hémoglobine à la sortie du capillaire chez des sujets normaux et chez des sujets atteints de fibrose pulmonaire. A noter que le ratio DL/Qc diminue suite à une diminution du temps de transit des érythrocytes dans les capillaires de la microcirculation pulmonaire. Chez les sujets atteints de fibrose pulmonaire, la plus faible densité capillaire anatomique conduit à une saturation en oxygène plus basse quel que soit le niveau d'intensité de l'exercice. En outre, la plus faible saturation artérielle en fonction du temps de transit s'explique également par une distribution inégale du rapport DL/Q parmi les capillaires restants. D'après (184).

L'un des principaux facteurs explicatifs de l'HIE, chez le sportif durant un exercice intense, concerne les troubles de la diffusion (12, 161). La formation d'un œdème pulmonaire interstitiel peut notamment, par accumulation de fluide dans l'espace interstitiel, augmenter la distance alvéolo-capillaire et donc nuire aux échanges gazeux (69, 70). Dans ce cadre, la

théorie du *stress failure* souvent avancée, suggère une origine double de cet œdème (409) ; d'une part, une origine hémodynamique causée par une augmentation des pressions vasculaires et donc des contraintes mécaniques exercées sur la paroi des capillaires pulmonaires – ce qui pourrait provoquer l'étirement et la rupture de la membrane alvéolocapillaire favorable à une fuite de fluide dans l'espace interstitiel - , et d'autre part une origine inflammatoire (12, 179, 314. Les facteurs hémorhéologiques semblent jouer un rôle important dans ce phénomène. En effet, à même niveau d'entraînement et à un niveau de viscosité et de déformabilité érythrocytaire comparable au repos, les athlètes ayant une HIE ont une viscosité sanguine plus élevée et une déformabilité érythrocytaire réduite durant l'effort par rapport aux athlètes n'ayant pas de d'HIE {Connes, 2004 #447). L'augmentation de cette viscosité sanguine pourrait se traduire par une augmentation des pressions vasculaires et donc des contraintes mécaniques exercées sur la paroi des capillaires pulmonaires (91).

Ainsi, nous avons vu que les altérations hématologiques et hémorhéologiques peuvent être impliquées dans l'hypoxémie artérielle au repos et l'HIE dans le contexte non-drépanocytaire. Néanmoins, il est à noter que l'HIE, dans le cadre d'une pathologie comme la drépanocytose, n'implique sans doute pas les mêmes processus que chez le sportif et pourrait résulter d'une amplification de l'hypoxémie artérielle observée au repos (72). L'implication des paramètres hématologiques et hémorhéologique dans l'hypoxémie de repos et l'HIE chez des patients drépanocytaires de génotype SC et SS a été testée dans l'étude n°2 de cette thèse. L'hypoxémie artérielle de repos semble être un facteur de risque d'AVC ischémiques (206, 323) et peut donc, dans certains cas, affecter l'oxygénation tissulaire.

IV.1.4 Transport et utilisation de l' $O_{\rm 2}$ par les tissus

La microcirculation est le site d'échange de l'O₂ avec les tissus. Les vaisseaux sanguins de la microcirculation comprennent les artérioles, les capillaires et les veinules et leur diamètre varie entre 100 et 200 μ m pour les artérioles et veinules les plus larges et 5 μ m pour les plus petits capillaires. Concernant la structure, tous ces vaisseaux possèdent une couche interne de cellules endothéliales. Les artérioles ont, quant à eux, une couche supplémentaire de cellules musculaires lisses qui intervient comme nous le verrons plus loin dans le contrôle et la distribution du sang dans les organes. L'épaisseur de la paroi des capillaires est d'environ 1 μ m. Ainsi les substances liposolubles telles que l'O₂ peuvent aisément traverser la paroi par diffusion passive selon le gradient de pression partielle. Cependant, il a été montré que les artérioles interviennent également dans la diffusion de l'oxygène vers les tissus (122, 190) (Figure 42).





Figure 42. A : Modélisation de l'apport d'oxygène par Krogh. Dans ce modèle chaque capillaire ("capillary") est considéré comme l'unique fournisseur d'oxygène pour une zone de tissu bien délimitée et représentée par un cylindre ("tissue cylinder") entourant ce capillaire. Ce modèle postule que l'oxygène diffuse dans une direction radiale de manière uniforme et constante. Ainsi le contenu en oxygène dans le capillaire ("oxygen content") diminue sur toute la longueur du capillaire ("Position along capillary"). B : La vision actuelle du transport (lignes continues) et de la diffusion (lignes pointillées) d'oxygène. La diffusion de l'oxygène peut également se faire des artérioles vers les tissus ou directement des artérioles vers les veinules. D'après (122).

IV.2 REGULATION DE L'OXYGENATION TISSULAIRE

Dans la partie précédente nous avons vu que l'oxygénation sanguine est dépendante d'un bon couplage cardiorespiratoire. Par ailleurs, nous avons vu que l'écoulement sanguin et donc le transport sanguin de l'O₂ est principalement régi par la concentration d'hémoglobine [Hb], la pression artérielle moyenne (PAM), la viscosité sanguine (η), la saturation artérielle en O₂ (dépendant de la pression partielle artérielle en O₂) ainsi que par la géométrie des 115 vaisseaux (principalement le rayon de la lumière du vaisseau). En outre, l'utilisation de l'O₂ par les tissus est également déterminée par la différence de pression partielle en O₂ (PO₂) entre la microcirculation et les tissus. Nous allons voir comment ces paramètres sont régulés pour permettre une oxygénation tissulaire adéquate. Nous traiterons des mécanismes de régulation au niveau de la microcirculation en différenciant la régulation de l'oxygénation cérébrale de celle des autres tissus dont le tissu musculaire.

IV.2.1 REGULATION DE L'OXYGENATION TISSULAIRE AU NIVEAU DE LA

MICROCIRCULATION

IV.2.1.1 HYPERHEMIE FONCTIONNELLE

Il a été montré que le contenu d'oxygène dans les artérioles diminue de deux tiers avant de parvenir au niveau capillaire (115, 190). La majorité de la perte du contenu en oxygène le long des artérioles provient du relargage d'oxygène par les érythrocytes situés près de la paroi artériolaire. Ainsi ces érythrocytes ont une saturation en hémoglobine plus faible que les érythrocytes au centre du vaisseau (73). Au niveau des bifurcations, cette distribution inégale de la saturation de l'hémoglobine en oxygène va affecter le contenu en oxygène des branches vasculaires en aval. Plus la constriction de ces branches est élevée moins elles reçoivent d'érythrocytes oxygénés et inversement plus elle est dilatée plus elles reçoivent d'érythrocytes (122) (Figure 43).



Figure 43. Impact de la diffusion artériolaire de l'oxygène vers les tissus sur la distribution de l'oxygène dans les vaisseaux en aval. Dans les artérioles, les érythrocytes au contact de la paroi relarguent en premier leur oxygène et sont donc moins saturés en oxygène que les érythrocytes au centre de l'artériole. Par conséquent, la distribution des érythrocytes oxygénés (représentés en rouge) vers les vaisseaux en aval est plus faible lorsque ce vaisseau est contracté (A, "Constriction"), que lorsqu'il est à l'état de repos (B, "Baseline") ou dilaté (C, "dilation"). Les érythrocytes représentés en violet et en bleu sont moins oxygénés que ceux représentés en rouge. D'après (122).

Il est donc important que les vaisseaux desservant des tissus actifs se dilatent. On parle alors d'hyperhémie fonctionnelle. L'hyperhémie fonctionnelle est l'adaptation du flux sanguin aux besoins métaboliques. Nous verrons que l'hyperhémie fonctionnelle est régie par les sous-produits du métabolisme qui ont une action sur la vasodilatation des vaisseaux. Puis, nous verrons que l'hypoxie locale joue également un rôle sur la vasodilatation des vaisseaux par le biais des globules rouges. Dans cette partie nous traiterons de l'hyperhémie fonctionnelle de manière générale telle qu'elle est régulée au niveau musculaire notamment. Nous verrons les spécificités de l'hyperhémie fonctionnelle cérébrale en partie IV.2.1.4.

IV.2.1.1.1AUGMENTATION DES BESOINS METABOLIQUES, PH, PCO₂, TEMPERATURE ET

RELARGAGE $D'O_2$ PAR L'HEMOGLOBINE

Nous avons vu précédemment que l'apport d'O₂ aux tissus se fait par diffusion passive. Lorsque les besoins métaboliques augmentent, le supplément d'énergie nécessaire (ATP) est produit par le biais d'une augmentation de l'extraction d'O₂ et par une augmentation de la production d'ATP par la glycolyse. Par conséquent, la production de CO₂ va augmenter (*c.-à-d.* entrée du pyruvate dans la membrane interne de la mitochondrie + production de CO₂ par le cycle de Krebs). Cette libération de CO₂ augmente la PCO₂ et diminue le pH du cytoplasme érythrocytaire par une augmentation de la concentration sanguine d'ions H⁺(*c.-à-d.* CO₂ + H₂O = H₂CO₃ (acide carbonique) = H⁺ + HCO₃⁻ (ion bicarbonate). La diminution du pH intra-érythrocytaire affaiblit la liaison entre l'hémoglobine et l'O₂. Le relargage d'O₂ par l'hémoglobine va accélérer l'apport d'O₂ aux tissus.

D'autre part, la chaleur est l'un des sous produits du métabolisme cellulaire, et les tissus actifs sont plus chauds que les tissus inactifs. L'augmentation de la température a une incidence directe et indirecte sur l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène (par son influence sur le métabolisme des érythrocytes et la synthèse du 2,3-DPG). Collectivement, ces facteurs conduisent à ce qu'une plus grande quantité d'O₂ se dissocie de l'hémoglobine au voisinage des tissus actifs (182).

IV.2.1.1.2 ADENOSINE MONOPHOSPHATE (AMP), ACIDE LACTIQUE, OSMOLARITE,

RELARGAGE DE POTASSIUM ET VASODILATATION

En condition de normoxie, l'adénosine diphosphate (ADP) produite lors de l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) est rephosphorylée par le processus de phosphorylation oxydative et la contribution de la production d'ATP par la glycolyse est alors négligeable. Cependant, lorsque l'apport d'O₂ diminue trop (hypoxie), tout l'ADP n'est pas rephosphorylée et une partie est dégradée sous forme d'adénosine monophosphate (AMP) puis en

adénosine. L'adénosine est un puissant vasorelaxant des cellules musculaires lisses. De plus, la production d'énergie par la glycolyse conduit à la formation d'acide lactique qui se dissocie en ions hydrogènes et en lactate. Les ions hydrogènes et les lactates ont tous deux des propriétés vasorelaxantes (261, 304). En outre, une augmentation de la phosphorylation oxydative augmente la production de CO_2 qui en se liant à l'eau du liquide interstitiel forme de l'acide carbonique qui se dissocie rapidement en bicarbonate et en ions H⁺ vasorelaxants. Les capillaires n'étant pas entourés de cellules musculaires lisses, l'augmentation de la concentration d'AMP, de lactate et d'ions H⁺ dans le liquide interstitiel entraîne une vasorelaxation en agissant sur les cellules musculaires lisses des artérioles au voisinage. Enfin le relargage d'ions potassium et l'augmentation de l'osmolarité du fluide interstitiel entraînent également une vasodilatation des artérioles en contact lors d'une augmentation de l'activité tissulaire (132, 304).

Il y a donc un lien très étroit entre l'oxygénation tissulaire et la production de métabolites vasorelaxants. Ainsi lorsqu'il y a une augmentation du métabolisme aérobie, et/ou un contenu artériel en oxygène inférieur aux besoins tissulaires, la concentration de ces métabolites augmente dans le liquide interstitiel. Cette augmentation est à l'origine d'une vasorelaxation des cellules musculaires lisses des artérioles au voisinage. La vasorelaxation des artérioles conduit à une augmentation du flux sanguin dans le tissu par un recrutement de capillaires supplémentaires (à l'exception du cerveau) (208). Cette augmentation du recrutement capillaire augmente la surface d'échange et réduit la distance de diffusion de l'O₂. La vitesse de diffusion de l'O₂ est donc augmentée et la concentration du métabolites vasorelaxant du liquide interstitiel diminue suite à une augmentation du débit sanguin local (Figure 44).



Figure 44. Régulation du flux sanguin par le métabolisme tissulaire. Les tissus actifs produisent des métabolites à l'origine d'une vasodilatation des cellules musculaires lisses. Cette vasodilatation est responsable d'une augmentation du flux sanguin et donc de l'apport en oxygène. Enfin cette augmentation du flux sanguin entraîne l'élimination des métabolites responsables de la vasodilatation initiale. Ainsi si l'activité tissulaire et la production de métabolites qui en découle cessent, le flux sanguin ralentit. Tissue Activity = activité tissulaire, Metabolite production = production de métabolites, [Vasodilator] in ISF = concentration de vasodilatateurs dans le liquide interstitiel, Metabolite Washout = élimination des métabolites, Oxygen Delivery = apport d'oxygène, Blood flow = débit sanguin, Perfusion pressure = pression de perfusion. VSM contraction = contraction des cellules musculaires lisses. D'après (304).

IV.2.1.1.3 LES ERYTHROCYTES INTERVIENNENT DANS LA DETECTION DU NIVEAU

D'OXYGENATION DU SANG ET LA REGULATION DU TONUS VASCULAIRE

Ellsworth et collaborateurs, ont posé l'hypothèse selon laquelle les érythrocytes sont des récepteurs mobiles sensibles à l' O_2 (122). Lorsque la saturation en oxygène de

l'hémoglobine diminue dans les tissus où la demande en oxygène est importante, il y a un changement de conformation de sa structure qui est transmise au niveau de la membrane érythrocytaire. Ceci conduit au relarguage d'ATP par l'érythrocyte. L'ATP va ensuite se fixer sur les récepteurs purinergiques des cellules endothéliales et entraîner la relaxation des cellules musculaires lisses artériolaires conduisant ainsi à une augmentation du flux sanguin et de l'apport en O₂ (Figure 45). D'autre études suggèrent que les érythrocytes peuvent également causer une vasodilatation des vaisseaux en relarguant du S-nitrosothiole (195) ou encore du monoxyde d'azote (NO) (105, 146, 294) lorsque la saturation en oxygène de l'hémoglobine des érythrocytes diminue.



Figure 45. Mécanisme de régulation du flux sanguin par les érythrocytes. Dans les tissus où la PO₂ est faible ("High oxygen demand") l'hémoglobine relargue son oxygène. Ce relargage est accompagné d'une diminution de la saturation en oxygène de l'hémoglobine ("SO₂") et à un changement conformationnel de la membrane et conduit au relargage d'adénosine triphosphate (ATP) de l'érythrocyte via l'activation d'une voie de signalisation (voir (122)). L'ATP se lie ensuite aux récepteurs purigéniques ("PR") de l'endothélium ("endo") qui initient la production de facteur relaxant par l'endothélium ("vasodilator"). La vasodilatation qui en résulte se propage en amont de la zone où se fixe l'ATP ("conducted vasodilation") jusqu'à une distance de 1,2 mm et cela à une vitesse de 50 μ m/s. Ce phénomène peut également se produire au niveau des veinules post-capillaires et se propager à l'intérieur du capillaire. Normal oxygen demand = demande en oxygène normale, SMC = cellules musculaires lisses. D'après (122).

IV.2.1.2 EFFETS DES CONTRAINTES DE CISAILLEMENT SUR L'HEMODYNAMIQUE

L'endothélium est constitué d'une simple couche de cellules endothéliales qui sur sa face interne (*c.-à-d.* lumière du vaisseau sanguin) se nomme couche endothéliale de surface.

Cette dernière se compose de protéines, glycolipides, glycoprotéines et glycosaminoglycans (317). Les domaines moléculaires constituant ce glycocalyx jouent de nombreux rôles dans la coagulation, le transport de l'oxygène, l'adhésion de molécules ainsi que dans la transmission des contraintes de cisaillement vers l'endothélium (c.-à-d. méchanotransduction).

Dans la microcirculation, la couche endothéliale de surface occupe une très large portion de l'espace lumineux du vaisseau. Cela a pour effet d'augmenter les résistances vasculaires et les forces de frictions (316, 317). Les variations de contraintes de cisaillements peuvent ainsi être enregistrées par la couche endothéliale de surface qui les transmet au cytosquelette et à d'autres capteurs de stress mécaniques tels que les protéines G et des canaux ioniques. La couche endothéliale de surface permet donc la transduction d'un signal mécanique, qui permet, via de nombreuses cascades de signalisation cellulaire, la production et/ou l'inhibition de certaines molécules régulatrices (anticoagulants, le monoxyde d'azote (NO), cytokines, molécules d'adhésion) (372, 406) (Figure 46). Un tel processus a pour but de protéger la fonction endothéliale d'un stress mécanique inadapté pouvant conduire à des processus inflammatoires (150, 155, 242). Parmi ces molécules régulatrices, la production de NO est sans doute la plus remarguable. En effet, le NO est un radical libre très réactif et sa libération va entraîner un certain nombre de modifications ayant un impact fort sur les paramètres hémodynamiques. La production de NO va engendrer une vasodilatation (379). Les contraintes de cisaillements peuvent ainsi diminuer les résistances vasculaires et engendrer une augmentation du flux sanguin (Figure 46).

Lorsque le stress mécanique (*c.-à-d.* augmentation des contraintes de cisaillement) se prolonge, comme cela peut être le cas en période d'exercice, l'activation du facteur de transcription NF- κ B semble être le principal responsable de la hausse de la production de NO, notamment via l'expression de l'enzyme NO-synthase (NOS) (382). Les effets bénéfiques de l'exercice, pour le traitement des maladies cardiovasculaires, pourraient donc être dépendants de l'activation de NF- κ B (154).

123

Les contraintes de cisaillement (comprises entre 0 et 50 dynes/cm² (0 – 5 Pa) selon les différents compartiments vasculaires) sont déterminées par plusieurs éléments (voir II.2.1) dont la viscosité sanguine (154).



Figure 46. Les contraintes de cisaillement enregistrées par la couche endothéliale de surface (ESL) sont transmises à la cellule endothéliale et permettent notamment la production de monoxyde d'azote (NO). D'après (154).

Cependant, la nature des contraintes de cisaillement est un élément essentiel à prendre en compte. Ainsi, l'augmentation des contraintes de cisaillement en condition de flux laminaire va conduire à une production de NO et par conséquent à une vasodilatation des vaisseaux sanguins alors qu'un flux turbulent et des contraintes de cisaillement oscillatoires vont, quant à eux, plutôt générer une surproduction de radicaux libres et entraîner une réponse inflammatoire. Des molécules d'adhésion (immunoglobulines et sélectines) sont alors exprimées par les cellules endothéliales, tout comme l'endothéline-1 (ET-1) un puissant 124

vasoconstricteur (80, 154). Les contraintes de cisaillement lors d'un flux turbulent produisent donc l'effet inverse des contraintes de cisaillement lors d'un flux laminaire en générant une vasoconstriction des vaisseaux et une augmentation des résistances vasculaires (154).

IV.2.1.3 VASOMOTION, FLOWMOTION ET AUTOREGULATION DU FLUX SANGUIN

Deux mécanismes présents dans de nombreux organes tels que le cerveau, les reins, le cœur ou les muscles peuvent également contribuer à la régulation de l'oxygénation tissulaire: l'autorégulation du flux sanguin et le vasomotion. L'autorégulation peut être définie comme la capacité d'un organe à maintenir relativement constant le flux sanguin en dépit des variations de la pression de perfusion (81). Le vasomotion, quant à lui, représente un flux lent et intermittent à travers la microcirculation et reflète l'action des artérioles précapillaires en réponse à des mécanismes de contrôle plus localisés par rapport à ceux de l'autorégulation (185, 394). Quelques études montrent que l'activité rythmique de l'autorégulation et celle du vasomotion sont corrélées suggérant un lien entre ces deux phénomènes (330, 429).

IV.2.1.3.1 AUTOREGULATION DU FLUX SANGUIN

L'autorégulation est un phénomène présent dans de nombreux lits vasculaires mais ce processus est particulièrement important au niveau cérébral. Nous traiterons donc plus en détail de l'autorégulation cérébrale (*partie IV.2.1.4.2 Spécificité de la régulation du flux sanguin au niveau cérébral*).

IV.2.1.3.2 VASOMOTION ET FLOWMOTION

Au niveau de la microcirculation, il existe une oscillation rythmique et localisée du diamètre des vaisseaux induite par des contractions et relaxations spontanées des cellules musculaires lisses. Ce phénomène d'oscillation rythmique et spontanée est appelé vasomotion (53, 253, 353) et les contractions et relaxations spontanées des cellules musculaires lisses qui composent ce vasomotion sont régulées par des mécanismes myogéniques, endothéliaux et neurogéniques (359). Le vasomotion est en partie à l'origine d'une oscillation du flux sanguin appelée flowmotion (354). Le flowmotion n'est cependant pas toujours une conséquence directe du vasomotion car il peut également être influencé par des facteurs périphériques à savoir la fréquence respiratoire et les fluctuations de la pression sanguine (193, 353, 407). Le ou les rôles physiologiques ou pathophysiologiques du vasomotion restent cependant, actuellement, encore débattus (3). De nombreuses études laissent à penser que le vasomotion pourrait jouer un rôle important dans les échanges de nutriments et d'oxygène entre le sang et les tissus avoisinants (3, 207, 238, 340, 343, 370, 378, 408).

ROLES POTENTIELS DU VASOMOTION

Il a été montré *in vitro* que le vasomotion est augmenté lorsque la tension à la paroi des vaisseaux correspondait à la limite inférieure de l'intervalle des pressions de perfusion pour lequel l'autorégulation est fonctionnelle (289). En outre, le vasomotion disparait lorsque la tension à la paroi des vaisseaux se situe sous la limite inférieure de l'intervalle des pressions de perfusion pour lequel l'autorégulation est fonctionnelle. Dans le cadre de la drépanocytose, il a été suggéré que l'activité du vasomotion s'accroît en réponse à une augmentation des résistances vasculaires (335). Cela suggère que la prévalence du vasomotion augmente quand la pression de perfusion de la microcirculation et/ou les

résistances vasculaires atteignent un stade critique à partir duquel l'apport sanguin dans un organe commence à être menacé.

Dans ce sens, chez les patients atteints de maladie artérielle périphérique occlusive modérée, la prévalence du vasomotion est augmentée (343). Lorsque ces patients sont divisés en deux groupes, à savoir ceux ayant une activité flowmotion et ceux n'ayant pas de flowmotion, le groupe ayant une activité flowmotion a une oxygénation tissulaire plus élevée que le groupe sans flowmotion, et ceci, malgré le fait que les deux groupes aient un débit sanguin comparable (343). Plusieurs études utilisant de la modélisation mathématique montrent ainsi que le vasomotion pourrait avoir un rôle physiologique dans l'apport d'oxygène aux tissus (207, 378). Tsai & Intaglietta (1993) montrent qu'un flux intermittent augmente le volume de tissu oxygéné par rapport à un flux constant. En effet, l'intermittence du flux permet d'augmenter le gradient d'oxygène entre les globules rouges et les tissus, favorisant ainsi le transfert d'oxygène. En accord avec Tsai & Intaglietta (1993), Kislukhin (2010) montre que le vasomotion peut augmenter de 8 fois l'apport en oxygène aux tissus pour un débit sanguin local comparable (207). D'autre part, Thorn et collaborateurs (2011) ont montré, chez 24 sujets adultes masculins, une association entre vasomotion et extraction d'oxygène dans la microcirculation cutanée (370) en couplant du laser doppler avec de la spectroscopie par réflectance optique au niveau de la microcirculation cutanée de l'avant bras. Dans leur étude, ils se sont intéressés à la périodicité du signal de spectroscopie à une fréquence de 0.02 Hz par transformation de Fourrier. La fréquence de 0.02 Hz représente la part de l'activité endothéliale du vasomotion (voir partie suivante mécanismes et mesure du vasomotion et flowmotion). Ils ont montré que la variabilité de la saturation en oxygène dans la microcirculation à cette fréquence possède un seuil minimum constant (bien que différents chez chacun des sujets). Quand ce seuil minimum est atteint, la saturation en oxygène augmente rapidement suite à un apport rapide et transitoire de sang et cela avec une modification minimale du volume de sang sous la sonde suggérant une vasodilatation en amont causée par une chute de la saturation en oxygène en aval (Figure 47). Cet apport 127

rapide et transitoire de sang est ensuite suivi par une période plus longue durant laquelle le flux et le volume sanguin restent relativement constants. Durant cette phase, la concentration d'oxyhémoglobine diminue de concert et dans les mêmes proportions que l'augmentation de la concentration de désoxyhémoglobine. Ces résultats supportent l'hypothèse que les globules rouges agissent comme des capteurs de l'hypoxie locale et seraient à l'origine de l'initiation de l'apport rapide et transitoire en sang quand la saturation en oxygène dans la microcirculation atteint un seuil critique (Voir partie IV.2.1.1.3).



time (s)

Figure 47. Représentation de l'activité endothéliale du vasomotion ("Flux") dans le temps ("time") en lien avec les variations de la saturation en oxygène de l'hémoglobine ($\Delta S_{mb}O_2$) et les variations de concentration d'oxyhémoglobine ($\Delta [HbO_2]$). Lorsque la $S_{mb}O_2$ et la $[HbO_2]$ atteignent un seuil minimum ("minimum"), une augmentation rapide et transitoire du flux sanguin ("flux") est observée accompagnée d'une augmentation rapide de la $S_{mb}O_2$ et de la $[HbO_2]$. H_{AUC} = aire sous la courbe $[HbO_2]$, F_{AUC} = aire sous la courbe du flux sanguin ("flux"). D'après (370).

Enfin, il a été montré que le vasomotion cérébral augmentait localement lors d'une activation du cortex cérébral suggérant un lien entre l'augmentation des besoins métaboliques et l'augmentation de la sollicitation du vasomotion (394) (Voir figure 48).



Figure 48. Puissance du signal flowmotion ("averaged PSD") dans l'intervalle de fréquence 0,02 - 2,00 Hz mesuré au repos (A) et lors d'une stimulation corticale (B). Le signal compris entre 0,02 et 0,2 Hz représente l'activité vasomotion ("PB1,PB2 et PB3"). Ce graphique montre qu'une activation corticale augmente l'activité vasomotion. A noter qu'une activation corticale est accompagnée d'une augmentation de la consommation d'oxygène par le tissu cortical activé. D'après (394).

Le vasomotion semble également jouer un rôle dans les échanges de fluides entre les tissus et les capillaires. Sakurai & Terui (2006) ont injecté un traceur (Cr-EDTA) dans la microcirculation de lapins au niveau de l'oreille et ont montré que la clairance du traceur du liquide interstitiel est plus rapide quand une activité vasomotion était présente (Figure 49) (340). D'autre part l'inhibition du vasomotion au niveau des testicules n'affecte pas le flux sanguin, mais est associé à une altération du fluide interstitiel et une réduction des échanges de nutriments et d'oxygène entre tissus et capillaires (238, 408).



Figure 49. Importance du vasomotion dans les échanges de fluide entre tissus et capillaires. L'élimination du traceur Cr-EDTA injecté (b) au niveau de l'oreille des lapins pour un même débit sanguin ("EBF") (a) est plus rapide lorsqu'une activité vasomotion est présente (tracés noirs) que lorsque cette activité est absente (tracés gris). Cela suggère que l'activité vasomotion est importante dans les échanges métaboliques entre tissus et capillaires. D'après (340).

Toutes ces études suggèrent donc que le vasomotion jouerait un rôle primordial dans la régulation de l'oxygénation et du métabolisme tissulaire.

MESURES DU FLOWMOTION ET DU VASOMOTION

Le flowmotion est un phénomène comprenant un large spectre de fréquences comprises entre 0.0095 et 2 Hz (217, 218). Le flowmotion est généralement mesuré par laser dopplerflow (LDF), enregistrement vidéo de la vitesse de flux des globules rouges, mesure de la tension en oxygène ou encore de la pression sanguine locale (51, 239, 240, 378, 408). On distingue la périodicité du signal aux hautes fréquences causée par les mouvements cardiaques et respiratoires de la périodicité du signal aux basses fréquences correspondant au vasomotion. Les basses fréquences du vasomotion sont subdivisées en trois bandes de fréquences distinctes, découvertes par blocages pharmacologiques, et faisant appel à des mécanismes endothéliaux, neurogéniques (c.-à-d. activité sympathique du système nerveux autonome) et myogéniques (359). Le vasomotion peut donc être étudié in vivo grâce à une analyse spectrale du flowmotion sans faire appel à la méthode invasive qu'est la microscopie intravitale. Ainsi, il a été montré que les mécanismes endothéliaux du flowmotion ont une fréquence d'activité comprise entre 0.009 et 0.02 Hz (219), la régulation neurogénique s'opère entre 0.02 et 0.06 Hz (357) et enfin la régulation myogénique, a une fréquence d'activité comprise entre 0.06 et 0.2 Hz (360). Il est à noter que la définition de ces bandes fréquentielles a été vérifiée uniquement pour la circulation cutanée et musculaire. Au niveau cérébral (394) l'existence de ces bandes de fréquences a été démontrée, néanmoins on ne sait pas si les mécanismes à l'œuvre sont les mêmes. Nous verrons plus loin que la bande comprise entre 0.02 et 0,06 Hz ne peut pas être contrôlée par le système nerveux autonome au niveau de la microcirculation cérébrale.

IV.2.1.4 SPECIFICITES DES MECANISMES DE LA REGULATION DU FLUX SANGUIN CEREBRAL Le système nerveux central dispose de réserves de glycogène et d'O₂ très réduites et dans le même temps possède un métabolisme très élevé. Bien qu'il ne pèse que 2% du poids du corps, il reçoit au repos 20% de l'apport énergétique et 16% de l'irrigation artérielle. Le

131

cerveau est donc un organe très dépendant d'une bonne vascularisation lui apportant un apport suffisant en O₂ et nutriments. D'autre part, le cerveau est encapsulé dans la boîte crânienne rigide.

La circulation cérébrale doit donc répondre à deux enjeux : apporter une quantité d'oxygène suffisante aux besoins cérébraux et d'autre part maintenir un volume liquidien relativement constant. Ces deux enjeux sont assurés par les mécanismes de l'hyperhémie fonctionnelle et de l'autorégulation cérébrale. Certains auteurs ne font pas la différence entre ces deux phénomènes et décrivent les mécanismes de l'hyperhémie fonctionnelle comme étant une composante de l'autorégulation cérébrale (81, 303).

Nous allons dans cette partie présenter les spécificités du système cérébrovasculaire avant de présenter les mécanismes en jeu dans l'hyperhémie fonctionnelle et de l'autorégulation cérébrale. Enfin, nous présenterons également quelques études suggérant que le vasomotion cérébral pourrait différer de celui observé au niveau musculaire et dans le reste de l'organisme.

IV.2.1.4.1 SPECIFICITE DE L'ARCHITECTURE DE LA CIRCULATION CEREBRALE

Le cerveau est irrigué par deux paires d'artères. A l'avant, les artères carotides internes irriguant chacune leur cortex cérébral (elles assurent plus de 80% de la perfusion totale) et à l'arrière deux artères vertébrales qui se rejoignent distalement pour former l'artère basilaire. On parle de système vertébro-basilaire. Le système vertébro-basilaire irrigue le tronc cérébral et le cervelet. Ces quatre grandes artères sont reliées entre elles à la base du cerveau pour former le polygone de Willis. Ce cercle artériel est un système d'anastomoses fonctionnant comme un système de suppléance vasculaire permettant au cerveau de recevoir du sang même si une des artères du cou est lésée ou occluse (180, 227). Les collatérales issues de ce polygone sont terminales, donc au-delà de cette structure anastomotique, il n'y a plus de suppléance vasculaire possible.

132

Le polygone de Willis donne naissance à trois paires d'artères sous-arachnoïdiennes principales : les artères cérébrales antérieures, moyennes et postérieures (Figure 50).



Figure 50. Représentation du polygone de Willis composé :

- des deux artères carotides internes [E] (droite et gauche), d'où sont issues les deux artères cérébrales antérieures [B] et [D] (droite et gauche); ces dernières sont jointes par l'artère communicante antérieure [C].
- et du tronc basilaire [G]: d'où naissent deux artères cérébrales postérieures [J] (droite et gauche) ainsi que deux artères communicantes postérieures [F] (droite et gauche) qui servent à relier les artères cérébrales postérieures aux artères carotides internes.

Ces artères sous-arachnoïdiennes sont entourées de liquide céphalo-rachidien et longent la surface du cerveau jusqu'à pénétrer perpendiculairement le tissu cérébral pour donner naissance aux artérioles du parenchyme entièrement entourées de terminaisons astrocytaires (81) (Figure 51).



Figure 51. Représentation d'une artère sous-arachnoïdienne donnant naissance à une artériole du parenchyme. Les artères sous-arachnoïdiennes ("pial artery") de la surface du cerveau sont innervées par des nerfs périvasculaires ("périvascular nerves") du système nerveux autonome. Ces artères donnent ensuite naissance aux artérioles du parenchyme ("intracerebral arteriole") en pénétrant perpendiculairement le tissu cérébral au niveau de l'espace de Virchow-Robin ("Virchow-Robin space"). Les artérioles du parenchyme vont ensuite donner naissance aux capillaires cérébraux. Les artérioles du parenchyme ainsi que les capillaires sont en contact avec des neurones intrinsèques ("intrinsic neuron") (c.-à-d. provenant du système nerveux central) et des pieds astrocytaires ("glial end-foot"). A noter que les artères sous arachnoïdiennes possèdent plusieurs couches de cellules musculaires lisses ("smooth muscle cells") alors que les artérioles du parenchyme n'en possèdent qu'une seule couche. Les capillaires cérébraux, quant à eux, ne possèdent pas de cellules musculaires lisses mais sont entourés de péricytes ("pericyte"). D'après (186).

Les artères et artérioles sous-arachnoïdiennes se distinguent des artérioles du parenchyme par des différences structurelles et fonctionnelles. Premièrement, les artères et artérioles sous-arachnoïdiennes sont innervées extrinsèquement par le système nerveux périphérique autonome tandis que les artérioles du parenchyme sont innervées intrinsèquement par des neurones et surtout des astrocytes du tissu cérébral (Figure 52).

Concernant l'innervation extrinsèque, les fibres sympathiques proviennent du ganglion cervical supérieur avec comme neurotransmetteurs primaires la noradrénaline et le neuropeptide Y (159) et les nerfs parasympathiques des ganglions optique et sphenopalatin avec comme neurotransmetteurs l'acétylcholine, le NO et le peptide vasoactif intestinal (140). Enfin, les artères et artérioles sous-arachnoïdiennes reçoivent également des fibres sensorielles du ganglion trigéminal (140).

Concernant l'innervation intrinsèque, les artérioles du parenchyme reçoivent des nerfs afférents provenant de neurones sous-corticaux (locus coeruleus, Raphé median, noyau fastigal et noyau de Meynert) qui se projettent sur les astrocytes entourant les artérioles du parenchyme et plus rarement directement sur ces artérioles (81). Ainsi ces neurones souscorticaux peuvent moduler le tonus vasculaire en libérant de l'acétylcholine, de la sérotonine, du NO ou de la noradrénaline qui se fixent sur des récepteurs spécifiques de l'endothélium, des cellules musculaires et des astrocytes (140).



Figure 52. Représentation schématique des différents types de nerfs périvasculaires. Les nerfs extrinsèques ("extrinsic nerves") innervant les artères sous-arachnoïdiennes de la surface du cortex cérébral ("cerebral cortex") proviennent du système nerveux périphérique ("PNS") sympathique et parasympathique (voir texte plus haut). Les vaisseaux sanguins du parenchyme cérébral ou de la microcirculation sont, quant à eux, innervés intrinsèquement par des nerfs ("intrinsic nerves") du système nerveux central (CNS) (voir texte). ACh = acétylcholine, CGRP = "*calcitonin gene-related peptide*", GABA = acide γ -aminobutyrique, NA = norépinéphrine, NKA = neurokinine-A, NOS = oxyde nitrique synthase, NPY = neuropeptide Y, PACAP = "*pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide*", SOM = somatostatine, SP = substance P, VIP = "*vasoactive intestinal polypeptide*", 5-HT = sérotonine. D'après (159).

L'innervation intrinsèque des artérioles du parenchyme est une spécificité de l'organisme. En effet, les artérioles du reste de l'organisme sont innervées extrinsèquement par le système nerveux autonome. De plus, contrairement aux artères sous-arachnoïdiennes, les artérioles du parenchyme sont entourées d'une seule couche de cellules musculaires lisses, possèdent un tonus basal plus élevé et ne réagissent pas à certains neurotransmetteurs qui ont un effet sur les artères sous-arachnoïdiennes (p. ex. serotonine, noradrénaline) (82). Dans la plupart des organes du corps, l'essentiel du contrôle des résistances vasculaires se situe au niveau des artérioles de la microcirculation. Il en est autrement pour le cerveau où les larges artères contrôlent 50% des résistances à l'écoulement (130, 170). Par voie de conséquence, du fait que les artérioles cérébrales sont exposées à une pression transmurale plus faible que dans les autres organes, les artérioles intracrâniennes possèdent des parois plus fines comparées aux artérioles de taille équivalente situées dans d'autres tissus, comme le muscle (38).

Les capillaires cérébraux possèdent également quelques particularités par rapport aux capillaires situés au niveau musculaire. Dans le cerveau presque tous les capillaires (~90%) sont perfusés en permanence (426) et le ratio capillaire/neuronne est de 1:1 avec une densité capillaire cérébrale variant considérablement en fonction des besoins énergétiques de la zone cérébrale concernée. La densité capillaire est ainsi 3 fois plus importante dans la substance grise (où les synapses sont plus nombreuses) que dans la substance blanche (414). D'autre part, dans les capillaires cérébraux, la vitesse de circulation des globules rouges est relativement élevée (~1 mm/sec) et hétérogène (entre 0.3 et 3.2 mm/sec) afin de s'adapter aux variations de la demande métabolique (185, 405). Ceci démontre qu'il y a un lien très étroit entre le compartiment neuronal et le compartiment vasculaire (427).

Au niveau structurel, les capillaires ont une perméabilité très sélective et forment ainsi ce que l'on appelle la barrière hémato-encéphalique (151). L'existence de cette barrière est principalement due à la spécificité des jonctions qui unissent les cellules endothéliales. En effet, les cellules endothéliales sont dépourvues de fenestrations (caractéristiques des 137 vaisseaux perméables) et établissent entre elles des jonctions serrées et des jonctions adhérentes complexes permettant ainsi d'éviter au liquide cérébral interstitiel de subir les fluctuations de la composition du sang. Seules les molécules apolaires, avec un coefficient de liposolubilité élevé (p. ex. O₂ et CO₂), peuvent franchir cette barrière. Quant aux molécules polaires - dont certaines (p. ex. glucose, acides aminés ou peptides circulants) sont essentielles au fonctionnement des neurones - elles peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique par le biais de transporteurs spécifiques (291). Cette particularité fait que le flux sanguin cérébral est peu sensible aux stimulus hormonaux qui ont une influence importante dans les autres lits vasculaires de l'organisme tel que le muscle.

Bien que les cellules endothéliales représentent les éléments primaires de la barrière hémato-encéphalique, sa perméabilité est régulée de manière plus large par ce que l'on nomme l'unité fonctionnelle neurovasculaire composée des cellules endothéliales mais également de péricytes, d'une membrane basale et de pieds astrocytaires. Les péricytes sont étroitement plaqués sur la surface externe des capillaires et recouvrent environ 25% de cette surface (le ratio péricytes/cellules endothéliales est de 1 :3 contre 1 :100 dans le muscle squelettique). Les pieds astrocytaires, quant à eux, recouvrent près de 99% de la surface externe de ces capillaires (Figure 53). Les péricytes jouent un rôle important dans la plasticité vasculaire (*c.-à-d.* remodelage des vaisseaux et angiogenèse) (381). Les astrocytes sont des cellules gliales qui font le relai entre les vaisseaux sanguins et les neurones du système nerveux central (16, 81, 381).



Figure 53. Représentation de l'unité fonctionnelle neurovasculaire composée des cellules endothéliales ("endothelial cell") mais également de péricytes, d'une membrane basale ("basal lamina") et de pieds astrocytaires ("astrocyte end foot"). Les cellules endothéliales et les péricytes sont séparés par une membrane basale. Les pérycites et les pieds astrocytaires recouvrent presque toute la membrane basale. lumen = lumière du vaisseau. D'après (160).

Par ailleurs, les astrocytes jouent un rôle important dans la régulation des jonctions serrés des capillaires formant la barrière hémato-encéphalique en assurant son développement et son entretien (177, 194, 215, 338, 356). Il semble que les péricytes soient également impliqués dans les interactions entre cellules endothéliales pour permettre le maintien de la barrière hémato-encéphalique (328). Les astrocytes et les péricytes jouent également, comme nous le verrons plus loin, un rôle important dans la régulation du flux sanguin et sont peut-être impliqués dans l'activité du vasomotion cérébral (voir *IV.2.1.4.2 Spécificité de la régulation du flux sanguin au niveau cérébral*).

Les cellules endothéliales, les péricytes et les astrocytes sont séparés entre eux par une membrane basale synthétisée par les cellules endothéliales et les astrocytes. Tandis que les cellules endothéliales jouent le rôle de barrière primaire pour les molécules chargées, la membrane basale est également négativement chargée et forme ainsi une barrière secondaire entre le sang et le liquide interstitiel cérébral.

Enfin, la barrière hémato-encéphalique possède un coût énergétique important (en plus du coût du métabolisme cérébral) pour permettre le passage des substances essentielles au bon fonctionnement du cerveau. Ainsi la densité mitochondriale de l'endothélium cérébral est bien plus importante que celle des autres tissus (265) et nécessite donc un apport constant en oxygène par le flux sanguin et explique, comme nous allons le voir maintenant, l'existence de mécanismes de régulation du flux sanguin plus développés que dans d'autres tissus tels que le muscle (304).

IV.2.1.4.2 Specificite de la regulation du flux sanguin au niveau cerebral

Comme nous venons de le voir, l'architecture de la circulation cérébrale diffère grandement de celle des autres tissus de notre organisme, comme le tissu musculaire par exemple. Ces différences s'expliquent par son métabolisme important et la nécessité d'une régulation très fine des fluides du fait que le cerveau est encapsulé dans une boite crânienne rigide. En effet, toute augmentation du volume liquidien peut causer une dangereuse augmentation de la pression intracrânienne, pouvant conduire à des complications neurologiques et à la mort. Nous allons donc voir que la régulation du flux sanguin au niveau cérébral diffère de celle du reste de l'organisme et du muscle dans la régulation de la relaxation ou de la contraction des cellules musculaires lisses (16).

HYPERHEMIE FONCTIONNELLE CEREBRALE

La circulation cérébrale répond, comme pour le muscle (voir *IV.2.1.1 hyperhémie fonctionnelle*), par une dilatation des vaisseaux suite à une augmentation de la PCO_2 . Cependant, contrairement à la circulation musculaire, cette réponse n'est pas causée par une production de CO_2 par le tissu cérébral lui-même.

En effet, durant l'activité neuronale, le pH extracellulaire devient d'abord alcalin plutôt qu'acide tel qu'on pourrait s'y attendre si la dilatation des vaisseaux était causée par une accumulation de CO₂ dans le liquide interstitiel (*c.-à-d.* **CO**₂ + H₂O = H₂CO₃ (acide carbonique) = \mathbf{H}^+ + HCO₃⁻ (ion bicarbonate) (16). Ceci s'explique par le fait que le CO₂ est rapidement éliminé par l'augmentation du débit sanguin suite à une augmentation de l'activité neuronale. Ainsi, contrairement au muscle, la vasodilatation ne se fait pas en réponse au CO₂ produit localement mais en réponse à un apport conséquent en provenance de la circulation sanguine.

Une réduction de la PO_2 n'a que peu d'effets sur le flux sanguin cérébral jusqu'au seuil critique de 50 mmHg. Sous ce seuil, le flux sanguin est affecté de manière importante et double lorsque la PO_2 passe de 50 à 30 mmHg (303). In vivo, la PO_2 tend à augmenter (et non à diminuer) avec l'activation neuronale suggérant que la PO_2 n'est qu'un mécanisme de régulation d'urgence. Enfin, l'hyperoxie n'a qu'un effet négligeable sur la constriction des vaisseaux (303).

Cependant, comme pour le muscle (partie IV.2.1.1), l'augmentation des concentrations de lactate (187) et d'adénosine (210) jouent un rôle dans l'augmentation du flux sanguin cérébral. Néanmoins, contrairement au muscle, cette régulation du flux par l'adénosine ou les lactates serait régulée par l'activité astrocytaire et neuronale (16) (voir plus bas). Par ailleurs, il semblerait qu'au niveau cérébral, l'augmentation de la concentration de K⁺ dans le liquide interstitiel soit le mécanisme initiateur de l'augmentation du flux sanguin avant que les 141

concentrations d'adénosine ou de lactates n'augmentent (380). La concentration extracellulaire de K⁺ est normalement de ~3 mM mais augmente jusqu'à 10-12 mM lorsque l'activité neuronale augmente. Ceci s'explique par une faible perte de K⁺ par l'axoplasme (367). Les ions K⁺ sont ainsi à l'origine d'une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses par une activation des pompes Na⁺/K⁺ ATPase et/ou des canaux KIR (*c.-à-d.* Potassium inward rectifier channels). Ceci a pour conséquence une fermeture des pompes à calcium voltage dépendant et une relaxation des cellules musculaires lisses (209, 246, 277, 422). Cependant lorsqu'un état d'hypoxie s'installe de manière prolongée, la concentration de K⁺ dans le liquide interstitiel chute et l'état de vasodilatation persiste. Ceci suggère que l'augmentation de la concentration d'ions K⁺ est importante dans l'initiation de la relaxation des cellules musculaires lisses mais que les autres sous-produits du métabolismes cérébral (adénosine, lactates, etc.) sont nécessaires au maintien de cet état de relaxation des cellules musculaires lisses en condition d'hypoxie prolongée (423).

D'autre part, une des grosses spécificités de la régulation du flux sanguin cérébral est que l'activité neurogénique est impliquée (et imbriquée avec les mécanismes métaboliques, tels que l'augmentation des concentrations de K⁺ et d'adénosine) pour assurer une adéquation entre les besoins et les apports énergétiques cérébraux (381).

En effet, contrairement aux artères, artérioles sous-archnoïdiennes et aux vaisseaux musculaires, les artérioles du parenchyme sont étroitement associées aux astrocytes et neurones périvasculaires. Ces deux types de cellules cérébrales jouent un rôle majeur dans le contrôle du flux sanguin cérébral (85, 159, 332).

Le relargage synaptique de glutamate active les récepteurs du N-methyl-D-aspartate (NMDAR) des neurones périvasculaires. Ceci conduit à une entrée de Ca²⁺ dans ces neurones périvasculaires et à une activation de l'oxyde nitric synthase neuronal (nNOS). La nNOS est à l'origine d'une production de monoxyde d'azote (NO) qui conduit à une dilatation 142

des vaisseaux sanguins (62) (Figure 54). L'augmentation de la concentration de calcium dans les neurones périvasculaires pourrait également générer de l'acide arachidonique (AA) (à partir de la phospholipase A_2 ; PL A_2) qui sera converti en prostaglandines (PG) par COX2. Les prostaglandines vont alors entraîner la vasodilatation des vaisseaux (16) (Figure 54). Les astrocytes sont également impliqués dans la régulation du flux sanguin cérébral. Le relargage de glutamate, lors de l'activité neuronale, active les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs) situés sur les astrocytes. Ceci a pour conséquence une augmentation de la concentration de Ca²⁺ au sein de l'astrocyte (311) et conduit à l'ouverture des canaux larges BK (large-conductance Ca²⁺ - activated K⁺ channels) au niveau des pieds astrocytaires et donc au relargage de K⁺ par les astrocytes (134). Ceci aurait pour conséquence la dilatation des vaisseaux (Figure 54).

L'augmentation de la concentration de calcium intra-astrocytaire (par l'activation des récepteurs mGluR) peut également activer la PLA2 entraînant la production d'AA conduisant à une production de PGs et d'acide epoxyeicsatrienoique (EETs). Les PGs ainsi que l'acide EETs vont permettre la dilatation des vaisseaux (16, 428) (Figure 54).

Cependant, il a également été montré sur des coupes de cerveaux et au niveau de rétines isolées que la même augmentation de la concentration de Ca²⁺ intra-astrocytaire pouvait conduire à une vasoconstriction des vaisseaux par la conversion de l'AA en acide 20-hydroxy-eicosatetraenoique (20-HETE) (252, 264) (Figure 54).



Figure 54. Représentation des différentes voies de signalisation cellulaire par lesquelles le glutamate régule le flux sanguin cérébral. Le glutamate peut se fixer sur les récepteurs du N-methyl-D-aspartate ("NMDAR") des neurones périvasculaires ("neuron") et sur les récepteurs métabotropiques du glutamate ("mGluR") des astrocytes. Cette fixation du glutamate sur les neurones périvasculaires et les astrocytes peut conduire à la vasorelaxation des vaisseaux ou à leur vasoconstriction (voir texte). Ca²⁺ = ions calcium, PLA2 = phospholipase A₂, AA = acide arachidonique, PG = prostaglandines, EET = acide epoxyeicsatrienoique, BKca = canaux larges BK (large-conductance Ca²⁺ - activated K⁺ channels), K⁺ = ions potassium, nNOS = oxyde nitrique synthase neuronale, NO = monoxyde d'azote, 20-HETE = acide 20-hydroxy-eicosatetraenoique, arteriole smooth muscle = cellule musculaire lisse de l'artériole, lumen = lumière de l'artériole, dilate = dilatation, constrict = constriction. D'après (16).

Il a été montré que le NO et l'O₂ modulent la signalisation neurovasculaire (16) en inhibant les enzymes à l'origine de la synthèse du 20-HETE (responsable de la constriction des vaisseaux) (337). L'inhibition de la synthèse de 20-HETE est de première importance et
montre que le NO peut jouer un rôle indirect dans la vasodilatation en s'assurant que l'acide arachidonique produit lors de l'activité neuronale ne va pas produire de 20-HETE mais seulement des acides EETS et PGs. Il est à noter qu'au niveau de la rétine, la présence de NO provenant des neurones induit une légère constriction par inhibition du vasodilatateur EETs suggérant que le NO peut avoir des effets opposés au niveau cérébral (252) (Figure 55). Ce résultat contradictoire peut s'expliquer par le fait que la production de NO par les neurones est modulée par les concentrations d'oxygène.



Figure 55. L'oxyde nitrique peut inhiber (en pointillés) la production du vasoconstricteur 20-HETE comme la production du facteur relaxant de l'endothélium EET. Pour la signification des abréviations voir Figure 54. D'après (16).

L'oxygène est nécessaire à la synthèse, par les neurones, de NO et des substances vasoactives dérivées de l'acide arachidonique (AA) par les astrocytes (EETs et PGs) (16). Lorsque la concentration en oxygène diminue, la synthèse de NO par les neurones est la première à être inhibée (Constante de Michaelis (Km) ~350 µM à 25°C) (365) suivie de la 145

synthèse de 20-HETE (Km ~ 55µM à 37°C) (164). Enfin, de plus faibles concentrations d'oxygène sont nécessaires pour inhiber les vasodilatateurs que sont l'EET (Km < 10 µM à 37°C) (164) et les prostaglandines (Km ~ 10 µM à 24°C) (26). Or les concentrations physiologiques d'oxygène dans le milieu extracellulaire sont comprises entre 13 et 60 µM (224, 283). Ces résultats suggèrent que la production de NO par les neurones (et donc l'inhibition de la production d'EET astrocytaire) est impossible à des concentrations physiologiques d'oxygène. En outre, la production de 20-HETE par l'AA n'est possible que lorsque la concentration d'oxygène se situe dans l'intervalle supérieur des valeurs physiologiques. Ainsi, lorsque la concentration en oxygène dans le liquide interstitiel chute, seuls les vasodilatateurs peuvent être synthétisés. Par conséquent, pour des valeurs physiologiques, une augmentation de la concentration intra-astrocytaire de Ca²⁺ conduit à une vasodilatation des vaisseaux. Lorsque la concentration en oxygène augmente de manière importante, la vasodilatation est stoppée par la production de 20-HETE (Figure 56) (16).



Figure 56. Les différentes voies de signalisation à l'origine de la production de facteurs relaxants ou contractants de l'endothélium sont régulées par le niveau d'oxygène. In vivo, les concentrations d'oxygène varient entre 13 et 60 µM. Ce seuil est plus élevé que celui nécessaire pour activer les enzymes à l'origine de la production d'EETs et de prostaglandines (PG) responsables de la vasodilatation des vaisseaux cérébraux. Cependant les concentrations physiologiques d'oxygène ne permettent pas la synthèse de NO par les neurones périvasculaires. Enfin la synthèse du vasoconstricteur 20-HETE n'est possible que lorsque la concentration d'oxygène atteint sa limite physiologique supérieure. L'oxygène est donc un régulateur important de la vasodilatation des vaisseaux cérébraux : lorsque le niveau d'oxygène diminue il y a vasodilatation et lorsque le niveau d'oxygène atteint un seuil important, il y a production du vasoconstricteur 20-HETE. Km = Constante de Michaelis-Menten. Pour les autres abréviations voir la Figure 54. D'après (16).

D'autre part, comme nous l'avons vu précédemment, lorsque la concentration d' O_2 est faible, il s'ensuit une augmentation des concentrations d'adénosine et de lactates. L'adénosine entraîne une vasodilatation en se liant aux récepteurs A_{2A} de l'adénosine. Les transporteurs de monocarboxylate relarguent le lactate dans l'espace extracellulaire où il entraîne la vasodilatation des cellules musculaires lisses (68). Par ailleurs, le lactate inhibe les transporteurs à prostaglandines et diminue ainsi leur clairance, augmentant par la même occasion la quantité de prostaglandines qui va générer une vasodilatation (153) (Figure 57).



Figure 57. La production de lactate et l'adénosine par la glycolyse, affecte les voies de signalisation neurovasculaires. Le lactate généré dans les neurones périvasculaires et les astrocytes est transporté dans le liquide interstitiel par les transporteurs de monocarboxylate ("MCT"). Ce lactate extracellulaire inhibe les transporteurs à prostaglandines ("PGT"), ce qui empêche la récupération des PGE2 par les astrocytes et favorise la vasodilatation des vaisseaux cérébraux. D'autre part, l'adénosine produite inhibe la production du constricteur 20-HETE en se fixant sur les récepteurs adénosine A_{2A}. Mitochondrion = mitochondrie, glycolysis = glycolyse. Pour les autres abréviations voir la Figure 54. D'après (16).

D'après toutes ces données, il est tout à fait envisageable que les neurones et astrocytes jouent un rôle majeur dans le vasomotion cérébral lors d'une hyperhémie fonctionnelle. Dans ce sens, l'étude de Vetri montre qu'une hyperhémie fonctionnelle augmente l'activité du vasomotion et suggère que l'activité des astrocytes et neurones périvasculaires influence principalement la bande de fréquence du vasomotion comprise entre 0.02 et 0.06 Hz (394) soit la bande de fréquence régulée par le système nerveux autonome au niveau musculaire (357).

ROLE POSSIBLE DES PERICYTES SUR LA REGULATION DU TONUS VASCULAIRE - UN LIEN POSSIBLE AVEC LE VASOMOTION CEREBRAL?

Une des spécificités de la circulation cérébrale est la présence d'une grande quantité de péricytes séparés de ~50µm d'intervalle tout le long des capillaires. Ces péricytes pourraient influencer le diamètre de la lumière des capillaires (160) (Figure 58).



Figure 58. Représentation des péricytes (en vert) au niveau des capillaires cérébraux ("capillary"). Smooth muscle = muscle lisse, lumen = lumière du vaisseau. D'après (160).

En effet, les péricytes expriment des protéines contractiles. Il a été montré que des vasodilatateurs et vasoconstricteurs pouvaient entraîner une relaxation ou constriction de péricytes mis en culture sur des membranes de caoutchouc (351). De plus, il a été montré que les péricytes de capillaires de rétines isolés peuvent se dilater ou se contracter en réponse à des neurotransmetteurs, suite à un changement de la concentration de calcium intracellulaire (de la même manière que sur la Figure 54) (319).

Les stimulus de contraction et sans doute de dilatation peuvent se propager d'un péricyte à un autre (299, 319). Il se pourrait ainsi que les neurones actifs, plus proches des péricytes (8-23 µm) que des artérioles (70-160 µm) (237), régulent le couplage neurovasculaire par le biais des péricytes et que la réponse vasculaire (vasodilatation ou vasoconstriction) soit transmise aux artérioles en amont (16). Il est donc tout à fait envisageable que le vasomotion cérébral soit dépendant de l'activité des péricytes bien qu'aucune étude n'existe à ce sujet.

AUTOREGULATION DU FLUX SANGUIN CEREBRAL ET VASOMOTION CEREBRAL

Peu d'études se sont intéressées au vasomotion cérébral. Cependant, plusieurs étude ont mis en évidence l'existence d'oscillations rythmiques au niveau de la microcirculation cérébrale à l'aide de la technique de spectroscopie dans le proche infrarouge (226, 282, 344). Ces études distinguent bien les pics de fréquences et ceux aux mêmes fréquences que celles observées ailleurs dans l'organisme (c.-à-d. ~0.03, 0.08 et 0.1 Hz). Cependant, aucune étude pharmacologique n'a identifié les mécanismes physiologiques à l'origine des oscillations pour chacune des fréquences observées. Nous avons vu, dans la partie précédente, que les astrocytes pourraient être responsables du vasomotion autour de pics de fréquences de 0,08 Hz (394).

D'autre part, il se pourrait que l'autorégulation et le vasomotion fassent partie d'un même ensemble de mécanismes de régulation du flux cérébral comme en témoignent les

150

corrélations trouvées entre la rythmicité de ces deux phénomènes chez les sujets au repos (voir figure 59) (330, 412, 429).

Ainsi, il a été montré que la perte de l'autorégulation cérébrale pouvait être décelée par une mesure du vasomotion de repos par spectroscopie dans le proche infrarouge, chez l'enfant prématuré (412) ou encore chez l'adulte ayant eu une hémorragie sous-archnoïdienne (429), pour remplacer la mesure classique, plus technique, de l'autorégulation par doppler transcrânien au niveau des grosses artères cérébrales (Figure 59). Enfin, Reinhard et coll., (330) ont montré qu'au niveau cérébral, au repos, les oscillations de la microcirculation suivent fidèlement (avec un décalage de 2 à 2,5 secondes) celles des artères cérébrales. Cependant, il a été montré que le vasomotion était augmenté lors d'une activation neuronale montrant ainsi que le vasomotion dépend fortement des mécanismes d'hyperhémie fonctionnelle (394). Or aucune étude n'a étudié les liens entre autorégulation et vasomotion lors d'une activité neuronale. Il est tout à fait imaginable que les correspondances observées disparaissent avec la présence du couplage neurovasculaire.



Figure 59. Comparaison entre flowmotion cérébrale et autorégulation cérébrale mesurés au repos. Le signal supérieur représente la variabilité de la vitesse du flux au niveau de l'artère cérébrale antérieure moyenne mesurée par doppler transcrânien. Il s'agit de la mesure classique de l'autorégulation cérébrale. En dessous, est représentée la saturation en oxygène au niveau de la microcirculation du cortex frontal (zone desservie par l'artère cérébrale antérieure moyenne) mesurée par spectroscopie dans le proche infrarouge. Le spectroscope du proche infrarouge représente une mesure de l'activité du vasomotion de la microcirculation. Il est à noter que la variabilité des deux signaux a la même structure, suggérant que l'autorégulation et le vasomotion cérébral font partie d'un même processus de régulation du flux cérébral. * représente la perte du signal par doppler transcranien. D'après (429).

Du fait d'un métabolisme aérobie important, le cerveau est un organe très vulnérable à l'hypoperfusion. Le cerveau possède donc des mécanismes d'autorégulation très développés. Chez l'adulte dont la tension artérielle est normale, le flux sanguin cérébral est autorégulé à une valeur d'environ 50 mL/100g de tissu cérébral/minute (81) lorsque la pression de perfusion varie entre 60 et 160 mmHg (81) (Figure 60).



Figure 60. Le flux sanguin cérébral ("blood flow") est presque indépendant de la pression de perfusion ("perfusion pressure") entre 60 et 160 mmHg. On parle d'autorégulation cérébrale. Il s'agit d'une propriété intrinsèque des vaisseaux sanguins indépendante de l'innervation par le système nerveux autonome. D'après (303).

Ces valeurs représentent les frontières de l'autorégulation cérébrale. En dessous de 60 mmHg et au delà de 160 mmHg, l'autorégulation cérébrale est perdue et le flux sanguin cérébral suit de manière linéaire les variations de la pression artérielle moyenne (83, 288). Lorsque la pression de perfusion tombe sous la limite inférieure de l'intervalle de pression pour lequel l'autorégulation cérébrale est fonctionnelle, le cerveau est menacé d'ischémie (180) et la réduction du flux sanguin cérébral est compensée dans un premier temps par une diminution de la saturation en oxygène avant de conduire à des signes cliniques d'hypoperfusion (181). Au-delà de la limite supérieure de l'autorégulation cérébrale, le phénomène de dilatation forcée survient (*voir ci-dessous - Mécanismes myogéniques de l'autorégulation du flux sanguin*). La perte du tonus myogénique durant la dilatation forcée entraîne une diminution des résistances cérébrovasculaires, conduisant à une augmentation importante du flux sanguin (300 - 400%) (125). Cette diminution drastique des résistances

vasculaires est à l'origine d'une augmentation de la pression hydrostatique sur l'endothélium cérébral qui peut conduire à la formation d'oedèmes (125, 197).

L'autorégulation cérébrale semble maintenue principalement par une composante myogénique (212). Certains auteurs incluent également une composante métabolique (81, 303) que d'autres qualifient plutôt d'hyperhémie fonctionnelle (16). Enfin, une composante neurogénique (*c.-à-d.* système nerveux autonome) semble également intervenir mais son impact sur l'autorégulation cérébrale est plus modéré.

INFLUENCES MYOGENIQUES DE L'AUTOREGULATION CEREBRALE

Les muscles lisses des larges artères de résistance et des artérioles se contractent en réponse à une augmentation de la pression transmurale et se dilatent en réponse à une diminution de la pression transmurale ; on parle également "d'effet Bayliss" du nom du scientifique qui a découvert ce phénomène (40). L'activité myogénique est primordiale pour la fonction hémodynamique et le maintien des résistances vasculaires protégeant ainsi les artérioles et les capillaires en aval de tout changement excessif de la pression de perfusion (251). La réponse myogénique provient des cellules musculaires lisses et persiste dans les artères ou artérioles privées de leur endothélium et de leur innervation sympathique (63). Cependant, le relargage de substances vasoactives par l'endothélium ou les nerfs périvasculaires peut augmenter ou diminuer le niveau du tonus myogénique et ainsi affecter les résistances vasculaires (81).

Le comportement myogénique d'un vaisseau à l'augmentation progressive de la pression sanguine se déroule en trois phases (288) :

 le tonus myogénique : il s'agit d'une distension passive de l'artère lorsque la pression de perfusion augmente.

- La réactivité myogénique : Malgré l'augmentation de la pression intramurale le diamètre du vaisseau est maintenu constant. L'hypothèse avancée est qu'il y a une réserve d'actine qui se lie au fur et à mesure avec la myosine alors que la pression augmente. Ce phénomène se produit dans l'intervalle des pressions de perfusion où l'autorégulation est fonctionnelle (288).
- La dilatation forcée : elle est définie comme une perte complète du tonus apparaissant lorsque la pression interne du vaisseau dépasse sa force de constriction. Lorsque la dilatation forcée apparaît, il y a perte d'autorégulation et le flux sanguin peut augmenter rapidement de 400% (125). On pense que les canaux K_{ca} sont impliqués et qu'il s'agit d'une vasodilatation active qui s'opère pour protéger les vaisseaux de tout dommage que pourrait causer une pression interne trop forte (295).

L'endothélium semble jouer un rôle dans le réflexe myogénique en agissant comme un capteur de la pression transmurale en libérant soit des vasoconstricteurs en cas d'augmentation de cette pression transmurale, soit du NO en cas de diminution de la pression transmurale (211).

Enfin, il semblerait que les mécanismes myogéniques de l'autorégulation puissent jouer un rôle plus important pour l'intervalle supérieur de l'autorégulation (pression de perfusion élevée) (251, 288). Son efficacité lors d'une augmentation de la pression de perfusion artérielle est telle que la constriction qui en découle peut réduire le diamètre du vaisseau à un niveau inférieur à son niveau initial (en particulier pour les vaisseaux de plus petits diamètres) (116).

Cependant, pour des pressions de perfusion inférieures (partie inférieure du rang de l'autorégulation cérébrale ~60 mmHg), il semblerait que les mécanismes métaboliques aient

une influence plus importante que le contrôle myogénique de l'autorégulation cérébrale (213).

INFLUENCES METABOLIQUES DE L'AUTOREGULATION CEREBRALE

Certains auteurs attribuent les mécanismes métaboliques de régulation du flux sanguin à ceux de l'autorégulation cérébrale (81, 303) alors que d'autres parlent plutôt d'hyperhémie fonctionnelle (16) pour décrire les même mécanismes de régulation du flux (voir plus haut). Au vu de la littérature, l'influence métabolique de l'autorégulation cérébrale et l'hyperhémie fonctionnelle sont deux termes différents qui ont la même définition (*c-à-d*. partagent les mêmes mécanismes) à savoir une adaptation du flux sanguin aux besoins métaboliques.

INFLUENCES NEUROGENIQUES DE L'AUTOREGULATION CEREBRALE

L'autorégulation cérébrale du flux sanguin est préservée chez l'animal dénervé de ses systèmes sympathiques et parasympathiques (63). Ceci démontre qu'une contribution majeure des facteurs neurogéniques extrinsèques présents au niveau des artères sousarachnoïdiennes est peu probable. De plus, dans l'intervalle de l'autorégulation, une activation sympathique à une intensité qui pourrait stopper le flux sanguin au niveau des reins ou sévèrement réduire celle de la peau ou des muscles squelettiques, n'a aucun effet sur le flux sanguin cérébral (303). Cependant, une augmentation de l'activité sympathique au niveau des artères et artérioles sous-archanoïdiennes conduit à décaler vers la droite l'intervalle de l'autorégulation lorsque la pression de perfusion artérielle est haute, protégeant ainsi la microcirculation cérébrale d'une pression et d'un flux sanguin excessif (121) (Figure 61). Inversement, une abolition des décharges sympathiques décale l'étendue de l'intervalle de l'autorégulation cérébrale vers la gauche, augmentant ainsi le risque que des dommages soient causés à la microcirculation pour des pressions de perfusion artérielles élevées (121) (Figure 61).



Figure 61. Influence du système nerveux sympathique sur l'autorégulation cérébrale. Une stimulation électrique de l'innervation sympathique des vaisseaux cérébraux décale vers la droite (courbe noire, ronds noirs) l'intervalle des pressions de perfusion ("perfusion pressure") où l'autorégulation cérébrale est effective. Cette activation des nerfs sympathiques permet de protéger la barrière hémato-encéphalique pour des pressions de perfusions élevées. Une inhibition pharmacologique ("α-blockade") ou une section des nerfs sympathiques ("cervical sympathectomy") décale l'intervalle de l'autorégulation vers la gauche (pointillé et ronds blancs). D'après (303).

V. EFFETS DES PARAMETRES HEMATOLOGIQUES ET

HEMORHEOLOGIQUES SUR LA VASOMOTRICITE ET L'OXYGENATION

TISSULAIRE

Si l'on se réfère uniquement à la loi de Poiseuille, toute augmentation de la viscosité se traduit par une augmentation des résistances vasculaires. Cependant, les vaisseaux sanguins, contrairement à des tubes rigides en verre, sont capables de modifier leur tonus. Nous allons voir que les paramètres hémorhéologiques interagissent avec l'endothélium et modifient le diamètre de la lumière des vaisseaux. Cette interaction entre les paramètres hémorhéologiques et l'endothélium varie fortement selon l'organe étudié (34). En effet, cette interaction hémorhéologie/endothélium dépend de la géométrie vasculaire de l'organe ainsi que de ses capacités d'autorégulation fortement dépendantes de sa réserve vasomotrice (34). La présence d'une interaction entre les paramètres hémorhéologiques et la régulation de la vasomotricité permet d'expliquer les différences de résultats observés entre les études in vitro et in vivo. Cependant, ces différences subsistent même lorsque la vasomotricité est inhibée. En effet, il a été montré qu'une augmentation de 57% de l'hématocrite augmente les résistances vasculaires de seulement 22% dans les coronaires sténosés alors qu'in vitro cette augmentation de l'hématocrite se traduit par une augmentation de 106% de la viscosité sanguine à forte contrainte de cisaillement (31). Nous verrons que la persistance des différences entre les résultats in vivo et in vitro, quand la vasomotricité est inhibée, peut être expliquée par les effets Fahraeus et Fahraeus-lindqvist, par le phénomène d'écrémage plasmatique et par l'hétérogénéité des hématocrites locaux dans la microcirculation. Nous verrons que ces phénomènes découlent de la migration axiale des érythrocytes et que ce phénomène donne une importance capitale à la viscosité plasmatique. Enfin, dans cette partie nous ferons également le lien entre altérations hématologiques et hémorhéologiques et leurs conséquences potentielles sur l'oxygénation tissulaire.

V.1 EFFET DE L'HEMATOCRITE

V.1.1 EFFET DE L'HEMATOCRITE SUR LA VASOMOTRICITE

In vitro, il a été montré que l'hématocrite est le déterminant majeur de la viscosité sanguine. Cependant, les mesures *in vivo*, sur les membres postérieurs chez le chien, montrent que l'impact de l'hématocrite sur la viscosité sanguine est fortement diminué (410) (Figure 62).



Figure 62. Viscosité sanguine apparente chez le chien déterminée simultanément *in vitro* à l'aide d'un viscosimètre et *in vivo* sur une préparation des membres postérieurs. D'après (410).

Fan et collaborateurs ont étudié les effets d'une variation de l'hématocrite entre 10 et 78% sur le flux sanguin dans différents organes à savoir le cœur, le cerveau, l'intestin, le foie, le rein et la rate. Durant cette expérimentation la pression artérielle est restée constante (129). Ils montrent que l'altération du flux sanguin en réponse aux variations d'hématocrite varie considérablement selon l'organe étudié. Le myocarde et le cerveau par exemple répondent à la diminution ainsi qu'à l'augmentation de l'hématocrite sous les valeurs basales par une vasodilatation tout en maintenant relativement constant l'apport en oxygène (129). En

revanche, le rein ou la rate répondent par une vasoconstriction à la fois lors de la diminution et lors de l'augmentation de l'hématocrite (129). Ceci peut s'expliquer par le fait que des organes comme le coeur ou le cerveau ont une réserve vasomotrice (*c.-à-d.* capacité à se dilater) plus importante que la rate et les reins et peuvent ainsi compenser l'augmentation ou la diminution du niveau d'hématocrite (31).

V.1.2. EFFET DE L'HEMATOCRITE SUR L'OXYGENATION TISSULAIRE

Une augmentation de la l'hématocrite se traduit par une augmentation du nombre de transporteurs d'oxygène. Cependant, si l'hématocrite augmente de manière trop importante, il peut y avoir une altération de l'écoulement sanguin. Nous venons de voir que cette altération de l'hémodynamique dépend de la réserve vasomotrice de l'organe étudié.

Il a été suggéré que le ratio hématocrite/viscosité sanguine mesuré à haute contrainte de cisaillement était un paramètre bien plus important que l'hématocrite et la viscosité sanguine étudiés séparément (93). Le ratio hématocrite/viscosité est un indice d'efficacité du transport de l'oxygène par les globules rouges. En effet, une augmentation de ce ratio signifie que le nombre de transporteurs d'oxygène augmente de manière plus importante que la viscosité sanguine. Ainsi, un ratio hématocrite/viscosité élevé traduit une efficacité du transport en oxygène sans pour autant que les résistances à l'écoulement soient trop augmentées (93). Ceci conduit à la notion d'hématocrite optimale (333). Dans ce sens, Verduzco & Nathan suggèrent qu'un hématocrite trop élevé ou trop faible sont des facteurs de risques d'accidents vasculaires cérébraux chez les patients drépanocytaires (391).

V.2 EFFET DU PLASMA

V.2.1 VISCOSITE PLASMATIQUE, VISCOSITE SANGUINE ET CONTRAINTES DE

CISAILLEMENTS

Toute augmentation de la viscosité plasmatique entraîne une augmentation de la viscosité sanguine et ainsi des contraintes de cisaillement exercées sur l'endothélium. Ainsi, Chen et collaborateurs ont démontré chez le chien que le flux sanguin régional varie de manière significative après une augmentation de la viscosité plasmatique d'un facteur 4 (76). Ils ont observé que le flux sanguin diminuait dans le petit intestin, la rate et la glande thyroïde tandis qu'il restait constant dans la plupart des autres organes concluant que ces variations de flux organo-dépendantes sont liées à la réserve vasomotrice de chaque organe (76).

V.2.2 VISCOSITE PLASMATIQUE, MIGRATION AXIALE ET CONSEQUENCES SUR LA

VASOMOTRICITE, L'HEMODYNAMIQUE ET LA DIFFUSION D'OXYGENE DANS LA

MICROCIRCULATION

L'effet de la viscosité plasmatique sur l'endothélium ne se limite pas à une augmentation des contraintes de cisaillement via une augmentation de la viscosité sanguine. Nous avons vu plus haut, que le phénomène de migration axiale des globules rouges sur le versant artériel et microcirculatoire est à l'origine de la formation d'un manchon plasmatique pauvre en cellules et situé au niveau de la périphérie du vaisseau au contact de la paroi endothéliale. Ainsi, le plasma est le principal élément en contact avec l'endothélium vasculaire : ce qui affecte de manière importante la vasomotricité, l'hémodynamique et la perfusion tissulaire (66, 174, 376, 377).

V.2.1.1 PARAMETRES DETERMINANTS DE L'EPAISSEUR DU MANCHON PLASMATIQUE ET DE LA MIGRATION AXIALE DES GLOBULES ROUGES

L'épaisseur du manchon plasmatique, soit la distance qui sépare l'endothélium de la frontière (variable) des globules rouges se déplaçant dans l'axe du vaisseau, varie en fonction de l'hématocrite, l'agrégation et la déformabilité érythrocytaire, la proportion du glycocalyx, le diamètre du vaisseau, le gradient de vitesse à la paroi ainsi que la surface de la membrane endothéliale (174, 424). Nous ne développerons ici que l'impact des paramètres hématologiques, hémorhéologiques et du glycocalyx sur cette épaisseur.

V.2.1.1.1 HEMATOCRITE, DEFORMABILITE ERYTHROCYTAIRE, AGREGATION

ERYTHROCYTAIRE ET EPAISSEUR DU MANCHON PLASMATIQUE

L'épaisseur du manchon plasmatique est fortement influencée par l'hématocrite. Sriram et collaborateurs ont montré expérimentalement, au niveau des artérioles (20-30 µm de diamètre) du muscle crémaster chez le rat, que l'augmentation de l'hématocrite est accompagnée d'une diminution de l'épaisseur du manchon plasmatique (358) (Figure 63).



Figure 63. Epaisseur du manchon plasmatique ("CFL width") en fonction de l'hématocrite systémique ("systemic Hct"). D'après (358).

Concernant les paramètres d'agrégation et de déformabilité érythrocytaires, Zhang et collaborateurs ont réalisé des simulations informatiques pour expliquer les effets de la déformabilité et de l'agrégation érythrocytaire sur l'épaisseur du manchon plasmatique et la migration axiale (424). Dans leurs simulations, ils ont fixé l'hématocrite à 32,2% et ont simulé un gradient de pression de 62,5 kPa/m (soit le gradient généralement observé dans la microcirculation). Dans leur simulation, l'épaisseur du manchon plasmatique est maximal lorsque la déformabilité érythrocytaire et l'agrégation érythrocytaire sont élevées (Figure 64). En effet, une agrégation élevée rend les globules rouges plus compacts et leur circulation est ainsi plus dans l'axe central du vaisseau. D'autre part, lorsque la déformabilité érythrocytaire et s'orientent ainsi plus difficilement dans le sens du flux (Figure 64). Enfin, ils observent également qu'un niveau d'agrégation érythrocytaire nul avec une déformabilité érythrocytaire faible (la situation qui se rapproche le plus de ce qui est

observé dans la drépanocytose) cause une absence de migration axiale et de manchon plasmatique (Figure 64).



Figure 64. Simulation du phénomène de migration axiale dans la microcirculation en fonction de la déformabilité et de l'agrégation érythrocytaire. Les images de gauches représentent une déformabilité érythrocytaire normale et celles de droite une déformabilité réduite. L'agrégation érythrocytaire est absente pour les images du dessus, modérée au centre et importante en bas. A noter que l'image en haut à droite représente la situation qui se rapproche le plus des paramètres d'agrégation et de déformabilité érythrocytaire observés chez les patients drépanocytaires (374). On peut donc supposer une migration axiale quasi-inexistante. D'après (424).

V.2.1.1.2 GLYCOCALYX ET EPAISSEUR DU MANCHON PLASMATIQUE

Nous avons déjà présenté la structure du glycocalyx dans la partie IV.2.1.2. Avec une épaisseur variant entre 0,5 et 3 µm, le glycocalyx est plus épais que la plupart des molécules d'adhérence (387). Le glycocalyx repousse les globules rouges de l'endothélium. Dans la microcirculation, il a été montré *in vivo* que la zone d'exclusion des érythrocytes au voisinage de l'endothélium diminue avec la détérioration du glycocalyx (401). La détérioration du 164

glycocalyx est également impliquée dans l'augmentation de l'adhésion plaquettaire et leucocytaire (174, 400) avec l'endothélium et joue donc un rôle dans le maintien de la fonction vasculaire (174). Chez les patients atteints de la drépanocytose, il a été montré que le volume du glycocalyx était réduit (387). C'est pourquoi, les interactions, entre les cellules endothéliales activées et les cellules et protéines présentes dans le sang, sont facilitées chez les patients atteints de la drépanocytose.

V.2.1.2 EPAISSEUR DU MANCHON PLASMATIQUE, VISCOSITE PLASMATIQUE, VISCOSITE SANGUINE ET CONSEQUENCE SUR LA VASOMOTRICITE

La viscosité plasmatique étant plus faible que la viscosité sanguine, les contraintes de cisaillement contre l'endothélium sont diminuées ainsi que la production de NO (66, 376, 377). D'autre part, l'épaisseur du manchon plasmatique influence également les contraintes de cisaillement exercées au niveau de la paroi endothéliale. En effet, plus le manchon plasmatique est épais et moins la migration axiale des globules rouges influence le gradient de vitesse du plasma ce qui a pour conséquence de diminuer encore plus les contraintes de cisaillement contre la paroi de l'endothélium (174).

Cependant, il a également été montré, par modélisation mathématique, que la présence d'un manchon plasmatique dans la microcirculation permet le maintien de la biodisponibilité du NO (64). En effet, la largeur du manchon plasmatique permet de séparer le NO de l'hémoglobine qui tamponne rapidement le NO et réduit ainsi sa biodisponibilité. Le NO produit possède donc le temps nécessaire pour diffuser vers les cellules musculaires lisses (64). Ainsi, la biodisponibilité du NO est augmentée avec l'épaisseur du manchon plasmatique. Si l'on s'en tient à cette modélisation, un hématocrite élevé, une déformabilité érythrocytaire réduite ainsi qu'une agrégation érythrocytaire réduite pourraient avoir des conséquences très néfastes sur la vasomotricité.

Néanmoins, cette modélisation mathématique ne tient pas compte de l'influence des contraintes de cisaillements sur la production de NO. Ainsi, dans une autre modélisation mathématique conduite par Sriram et collaborateurs, il a été montré qu'une augmentation de l'hématocrite conduirait à une augmentation de la biodisponibilité du NO (358). Cette modélisation mathématique a été effectuée en faisant varier l'hématocrite dans l'intervalle de variabilité trouvé dans la population normale (39 à 51%). Dans un premier temps, ils montrent expérimentalement que l'épaisseur du manchon plasmatique diminue avec l'augmentation de l'hématocrite (Figure 65). Ainsi, lorsqu'ils modélisent la biodisponibilité du NO et la pression partielle en O₂ (lorsque l'effet des contraintes de cisaillements sur la production de NO est négligé), ils observent que la concentration de NO diminue sensiblement lorsque l'hématocrite augmente la quantité de NO consommé par l'hémoglobine; et (2) que l'augmentation de l'hématocrite diffusion que le NO doit parcourir à travers le manchon plasmatique pour être consommé par l'hémoglobine.

Cependant lorsque la modélisation mathématique tient compte de l'influence d'une augmentation de l'hématocrite sur les contraintes de cisaillements appliquées à la paroi endothéliale, l'inverse est observé. Une augmentation de l'hématocrite augmente la viscosité sanguine qui augmente à son tour la contrainte de cisaillement à la paroi vasculaire stimulant ainsi la production de NO et conduisant à une augmentation de la biodisponibilité du NO (358) (Figure 66).

L'effet positif de l'augmentation de l'hématocrite sur la biodisponibilité du NO cesse lorsque la capacité de production maximale de NO en fonction des contraintes de cisaillement a été atteinte (Figure 66) (358).

A noter que la relation entre contraintes de cisaillement et production de NO est très variable selon les études et que selon la valeur choisie, la relation hématocrite et biodisponibilité du NO varie grandement (Figure 66) (358). Il semble cependant que cette relation soit le mieux 166 illustrée par une courbe en forme de S (Figure 66, scénario m = 5) (77, 174). Enfin, plus la couche de glycocalyx est épaisse plus la biodisponibilité du NO est importante (358).



Figure 65. Variation de la concentration de NO (" C_{NO} ") en fonction de la distance par rapport au centre du vaisseau ("radial distance") et ce pour différents hématocrites (39, 45 et 51%). La modélisation de gauche ne tient pas compte de la production de NO due aux contraintes de cisaillements contrairement à la modélisation de droite. Dans la modélisation de droite, la relation moyenne entre contrainte de cisaillement et production de NO a été retenue. La distance radiale à 0 microns représente le centre du vaisseau sanguin (*c.-à-d.* le diamètre du vaisseau est de 20 µm). La concentration en NO y est nulle car celui-ci est entièrement consommé par l'hémoglobine présente. Puis quand on se rapproche de la paroi du vaisseau (c.-à-d. distance radial = 10 µm), cette concentration augmente régulièrement jusqu'au niveau des cellules musculaires lisses (distance radiale = 20 µm) où le NO est ensuite consommé. A noter que lorsque l'hématocrite augmente, la biodisponibilité du NO diminue lorsque l'on ne tient pas compte des effets des contraintes de cisaillement. L'inverse est observé lorsque la modélisation tient compte des contraintes de cisaillements. D'après (358).



Figure 66. Production de NO au niveau de la paroi vasculaire ("Peak [NO]") en fonction des contraintes de cisaillement générées par l'hématocrite ("systemic hematocrit") (graphique de gauche). "m" définit la cinétique de la relation entre contrainte de cisaillement ("normalized shear stress") et production de NO maximal ("RNO_{max}"). "m" est un nombre représentant la vitesse à laquelle la courbe atteint son asymptote. (Graphique de droite). A noter que selon le nombre m, le scénario diffère grandement. le scénario m = 5 semble le plus plausible (77, 174). D'après (358).

V.2.1.3 EPAISSEUR DU MANCHON PLASMATIQUE ET CONSEQUENCE SUR LA DIFFUSION DE L'OXYGENE VERS LES TISSUS

Nous avons vu dans la partie II que le phénomène de diffusion est efficace uniquement sur de courtes distances. La présence d'un manchon plasmatique représente ainsi une barrière à la diffusion de l'oxygène vers les tissus (174). Cependant, ce phénomène semble diminué par la convection créée par la variabilité de l'épaisseur du manchon plasmatique dans le temps du fait de la circulation sanguine (54). En effet, l'orientation aléatoire des globules rouges et l'espace qui sépare les globules rouges circulant fait que la limite entre la couche axiale de globule rouge et le manchon plasmatique est variable dans le temps (54).

V.2.1.4 EPAISSEUR DU MANCHON PLASMATIQUE, MIGRATION AXIALE DES ERYTHROCYTES

ET HETEROGENEITE DES HEMATOCRITES

Le phénomène de migration axiale des globules rouges a pour conséquence que certaines bifurcations du réseau microcirculatoire reçoivent moins de globules rouges ou même uniquement du plasma (on parle alors d'écrémage plasmatique" ou de "plasma skimming effect") (Figure 67). De manière générale la branche de plus fort débit reçoit une proportion de globules rouges plus grande que la branche de plus faible débit. La conséquence est évidemment une hétérogénéité des hématocrites locaux entre les branches d'une même bifurcation, et plus généralement entre les différents microvaisseaux (34). Ainsi, l'oxygénation tissulaire dépend du phénomène de migration axiale.



Figure 67. Migration axiale et écrémage plasmatique. La migration axiale des globules rouges favorisée par l'agrégation érythrocytaire entraîne une hétérogénéité des hématocrites entres les différents microvaisseaux. A noter que certains microvaisseaux peuvent ne recevoir que du plasma. Ce phénomène est appelé "plasma skimming" ou écrémage plasmatique. D'après (250).

V.3 EFFET DE LA DEFORMABILITE ERYTHROCYTAIRE

La déformabilité érythrocytaire est le déterminant le plus important des résistances vasculaires dans la microcirculation capillaire et peut influencer le recrutement capillaire mais également augmenter les résistances vasculaires dans les vaisseaux plus large (34, 37, 292).

V.3.1 INTERACTION ENTRE DEFORMABILITE ERYTHROCYTAIRE ET VASOMOTRICITE DANS

LA CIRCULATION ARTERIELLE

La réserve vasomotrice d'un organe joue un rôle important dans le contrôle des résistances vasculaires quand la déformabilité érythrocytaire est réduite (34). Baskurt et collaborateurs ont montré les effets d'une diminution de la déformabilité érythrocytaire au niveau de l'artère fémorale chez le rat (37). Dans cette étude, la déformabilité érythrocytaire a été réduite à l'aide de glutaraldehyde. Une diminution de 16% de la déformabilité érythrocytaire à faible contrainte de cisaillement a entraîné une augmentation de 78% des résistances vasculaires à l'écoulement sanguin (Figure 68). De plus, après avoir inhibé l'activité des cellules musculaires lisses à l'aide de papavérine, cette réduction de la déformabilité érythrocytaire à l'écoulement sanguin (Figure 68). Cette étude montre clairement que la déformabilité érythrocytaire à fiele contrainte affecte la circulation artérielle et que la réserve vasomotrice d'un organe est essentielle pour essayer de compenser l'effet de la rigidification érythrocytaire. Cette compensation n'est cependant pas totale lorsque la déformabilité érythrocytaire est trop réduite ; ce qui peut être le cas dans la drépanocytose.



Figure 68. Altérations des résistances à l'écoulement sanguin ("change in flow resistance") en réponse à une diminution de la déformabilité érythrocytaire ("change in RBC deformability"). Les carrés blancs représentent l'altération des résistances à l'écoulement sanguin quand la vasomotricité est intacte et les carrés noirs quand l'activité des cellules musculaires lisses a été inhibée à l'aide de papavérine ("papaverin"). A noter que la réserve vasomotrice joue un rôle majeur dans le contrôle des résistances vasculaires à l'écoulement. D'après (37).

V.3.2 DEFORMABILITE ERYTHROCYTAIRE, RECRUTEMENT CAPILLAIRE ET OXYGENATION TISSULAIRE

Il a été démontré que le réseau microvasculaire s'adaptait à une diminution de la déformabilité érythrocytaire en redistribuant (*c.-à-d.* shunt) les globules rouges peu déformables vers des vaisseaux de la microcirculation offrant moins de résistance car plus large (232, 292). Ainsi, Parthasarathi et Lipowsky ont montré que le recrutement capillaire était affecté dans le muscle *cremaster* du rat lorsqu'on y injectait des globules rouges humains de plus grandes dimensions par rapport à des globules rouges de rat (292). Pour ce faire, ils ont observé la microcirculation d'un réseau capillaire complet, des artérioles

terminales aux veinules collectant le sang. Leurs résultats montrent qu'en condition d'hypoxie, pour les rats dans lesquels circulent les globules rouges de rats, le débit sanguin artériolaire et le volume total de sang dans le réseau vasculaire étaient augmentés de trois fois alors que le ratio " temps transit des globules rouges/temps de transit du plasma " et le ratio " hématocrite local/hématocrite systémique " restaient constants. Ce résultat démontre un recrutement spatial des capillaires augmenté. En revanche, quand ils injectent des globules rouges humains dans la circulation, et cela dans les même conditions expérimentales, ils constatent que le ratio " temps de transit des globules rouges/temps de transit du plasma " ainsi que le ratio « hématocrite local/hématocrite systémique" diminuent alors que le débit sanguin artériolaire est augmenté de 3 fois et que le volume des globules rouges dans la microcirculation augmente peu par rapport au volume de plasma. Cela suggère que les globules rouges moins déformables sont redistribués vers des vaisseaux plus larges et que la majorité du réseau capillaire est perfusé en plasma. Ainsi une déformabilité érythrocytaire réduite, comme dans le cas de la drépanocytose, est susceptible de diminuer l'apport d'oxygène aux tissus.

V.4 EFFETS DE L'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE

Les effets de l'agrégation érythrocytaire sur le flux sanguin *in vivo* sont complexes. Nous avons vu précédemment que l'agrégation érythrocytaire était un déterminant important de la viscosité sanguine à faible vitesse de cisaillement ; c'est-à-dire dans le versant veineux. Nous avons également relaté qu'une augmentation de l'agrégation érythrocytaire augmente le phénomène de migration axiale des globules rouges sur le versant artériel diminuant ainsi les résistances à l'écoulement, du moins dans les vaisseaux orientés verticalement (34). *In vivo* les effets de l'agrégation sur les résistances à l'écoulement varient énormément d'une étude à l'autre. Les études utilisant la microscopie intravitale pour étudier l'agrégation d'une augmentation de l'agrégation étythrocytaire semblent unanimes et montrent qu'une augmentation de l'agrégation étythrocytaire semblent unanimes et montrent qu'une augmentation de l'agrégation de l'agréga

érythrocytaire conduit à une augmentation des résistances à l'écoulement sanguin (249, 396). Cependant, les études utilisant la technique de la perfusion dans un organe isolé montrent que l'agrégation érythrocytaire peut augmenter (336), diminuer (75) ou ne pas modifier les résistances vasculaires (392).

Les différences de résultats entre la technique de microscopie intravitale et l'étude des résistances avec l'aide de la technique de perfusion sur organe isolé peuvent être imputées au fait que la microscopie intravitale étudie principalement les vaisseaux sanguins orientés horizontalement et donc favorisant la sédimentation érythrocytaire par effet de gravité (33). La technique de perfusion sur organe isolé semble donc plus appropriée car les vaisseaux sanguins sont orientés dans toutes les directions et reflète l'impact réel de l'agrégation érythrocytaire dans l'organe étudié. Cependant, il reste donc à comprendre pourquoi les résultats divergent fortement d'une étude à l'autre avec cette dernière technique.

Cette divergence pourrait être expliquée par les résultats d'une étude de Yalcin et collaborateurs (419). Dans cette étude, les auteurs ont travaillé sur le membre postérieur de cochon. Ils ont augmenté graduellement le niveau d'agrégation érythrocytaire à l'aide de pluronic F98 (PF98). Le PF98 promeut l'agrégation des globules rouges en augmentant l'agrégabilité érythrocytaire. Cette technique constitue un avantage par rapport aux études précédentes qui avaient utilisé du Dextran dont les effets se font ressentir à la fois sur l'agrégation érythrocytaire et la viscosité plasmatique. Ainsi, l'utilisation du PF98 permet d'isoler les effets de l'agrégation érythrocytaire sur les résistances vasculaires. Les globules rouges traités sont ensuite resuspendus dans le plasma. Cinq niveaux d'agrégation ont été retenus en faisant varier les concentrations de PF98 entre 0,0125 à 0,5 mg/ml. Quand l'activité des cellules musculaires lisses est inhibée, les résultats montrent une relation triphasique entre les résistances vasculaires à l'écoulement sanguin et le niveau d'agrégation érythrocytaire (Figure 69) (419):

173

- Dans un premier temps une augmentation du niveau d'agrégation érythrocytaire se traduit par une augmentation des résistances vasculaires à l'écoulement. Ceci peut être expliqué par le fait que la formation de rouleau perturbe l'écoulement sanguin en causant une distorsion des différences couches de fluide.
- Dans un second temps, une augmentation supplémentaire du niveau d'agrégation érythrocytaire se traduit par une diminution des résistances vasculaires à l'écoulement et s'explique sans doute par l'apparition d'une migration axiale des globules rouges.
- Enfin, une augmentation supplémentaire du niveau d'agrégation érythrocytaire se traduit par une nouvelle augmentation des résistances à l'écoulement sanguin. Cette nouvelle augmentation s'explique probablement par le fait que les agrégats nouvellement formés augmentent l'énergie nécessaire pour les séparer à l'entrée de la microcirculation.

Enfin, quand la vasomotricité n'est pas inhibée cette relation triphasique s'observe encore mais est atténuée (Figure 69) (419).



Figure 69. Effet de l'augmentation de l'agrégation érythrocytaire ("F98-SC concentration") sur les résistances à l'écoulement sanguin ("change in flow resistance"), étudiées par perfusion du membre postérieur isolé chez le cochon de Guinée. Les carrés blancs représentent les résultats de l'expérimentation quand l'activité des cellules musculaires lisses est inhibée à l'aide de Papavérine ("papaverin"). Les carrés noirs représentent les résultats de l'expérimentation quand l'activité des cellules musculaires lisses n'est pas inhibée (mais indépendante de l'activité du système nerveux autonome). D'après (419).

Enfin, il est à noter que l'agrégation érythrocytaire est fortement influencée par la pression de perfusion expliquant pourquoi l'agrégation érythrocytaire est un phénomène qui influence plus la circulation veineuse que la circulation artérielle (34). Ainsi, Kim et collaborateurs ont montré qu'une augmentation de l'agrégation érythrocytaire dans le muscle spino-trapèze chez le rat n'a que peut d'effet sur le recrutement capillaire lorsque la pression de perfusion était normale. Cependant, lorsque la pression de perfusion fut réduite à 25 mmHg, les auteurs ont observé une diminution du recrutement capillaire (204).

V.7 CONCLUSIONS

Nous venons de voir comment les paramètres hémorhéologiques peuvent interagir de manière complexe entre eux (voir partie II) mais aussi avec l'endothélium, et influencer la vasomotricité, la densité capillaire fonctionnelle et l'oxygénation tissulaire (Figure 70). Les patients drépanocytaires sont caractérisés par de nombreuses anomalies hématologiques et hémorhéologiques (voir Tableau 1). Mais peu d'études ont testé les associations entre ces anomalies de la rhéologie du sang, la vasomotricité et l'oxygénation tissulaire dans le cadre de la drépanocytose. Une meilleure compréhension de ces relations chez le drépanocytaire permettra d'envisager de mieux cerner les mécanismes à l'origine de certaines complications aigus/chroniques et d'envisager des thérapies ciblées. Ainsi, nous avons testé les relations entre le profil hémorhéologique des patients atteins de la drépanocytose et les niveaux d'oxygénation tissulaire (cérébrale/musculaire) et sanguine, dans nos études 3 et 4.



Figure 70. Interactions entre les paramètres hémorhéologiques, l'endothélium, la vasomotricité et l'oxygénation tissulaire. Certaines relations sont occultées dans cette figure pour une question de clarté (voir figure 27 pour les intéractions manquantes). En jaune, les paramètres influençant directement la migration axiale des érythrocytes. En rouge, les paramètres influençant directement la viscosité sanguine. En vert, les paramètres influençant directement la perfusion tissulaire en oxygène. Le bleu est la couleur par défaut.

VI. EXERCICE ET DREPANOCYTOSE

Nous avons vu dans les chapitres précédents que les processus initiaux de polymérisation de l'hémoglobine S et de déshydratation/cristallisation de l'hémoglobine C conduisent à des altérations de la rhéologique sanguine. Ces altérations de la rhéologie du sang sont à l'origine de troubles hémodynamiques bien qu'un certain nombre d'adaptations soit présent. Ces altérations hémorhéologiques sont dépendantes du relargage d'oxygène par l'hémoglobine S, de la diminution du pH, de la déshydratation des érythrocytes et de l'hyperthermie. Or, bien que l'exercice physique puisse être très bénéfique pour la santé dans un certain nombre de pathologies telles que l'asthme (47) ou le diabète de type 2 (285), tous ces processus sont exacerbés lors de la réalisation d'une activité physique. Ainsi, dans ce chapitre, nous présenterons les interactions entre exercice physique et rhéologie sanguine chez le sujet sain, puis la balance bénéfice/risque de l'exercice physique chez les patients drépanocytaires.

VI.1 INTERACTION ENTRE ACTIVITE PHYSIQUE ET LES PARAMETRES

HEMORHEOLOGIQUES CHEZ LES SUJETS SPORTIFS

VI.1.1 INFLUENCE DES PARAMETRES HEMORHEOLOGIQUES SUR LA PERFORMANCE AEROBIE

Plusieurs auteurs rapportent un certain nombre de corrélations entre les paramètres hémorhéologiques et la performance aérobie (59, 60, 93, 103, 124, 143). Ainsi, il a été suggéré qu'une diminution de la viscosité sanguine et de l'hématocrite pourrait améliorer l'apport d'oxygène aux tissus durant l'exercice chez des sujets entraînés (59, 143).

D'autre part les propriétés d'agrégation érythrocytaire et de déformabilité érythrocytaire semblent jouer également un rôle important dans la performance aérobie. Chez les porteurs du trait drépanocytaire, une diminution de la performance aérobie a été rapportée lorsque les 178

données sont comparées à des sujets contrôle (97, 369). Cette réduction de la performance aérobie lors d'efforts soutenus et prolongés chez les porteurs du trait drépanocytaire pourrait être liée aux propriétés de déformabilité (réduite) et d'agrégation érythrocytaire (seuil de désagrégation érythrocytaire élevé) de cette population par rapport aux sujets contrôles (260, 374, 375). Récemment, deux études suggèrent un rôle important des propriétés hémorhéologiques dans l'adaptation aérobie lors d'un effort d'endurance (99, 352).

VI.1.2 CONSEQUENCES DE L'EXERCICE PHYSIQUE AIGU ET CHRONIQUE SUR LES

PARAMETRES HEMORHEOLOGIQUES CHEZ LES SPORTIFS

Les effets de l'exercice physique sur la rhéologie du sang sont complexes. Ainsi Brun et collaborateurs ont suggéré que ces effets seraient triphasiques (59) et distinguent les effets d'un exercice aigu, des effets à moyen terme s'opérant durant la récupération, ainsi que des effets à long terme de l'entraînement. Dans ce modèle l'exercice aigu conduit à une élévation de la viscosité sanguine perçue comme une altération de la rhéologie sanguine. Puis, durant la récupération, les paramètres hémorhéologiques reviendraient à la normale. Enfin, un entraînement sur le long terme conduit à une diminution chronique de viscosité sanguine perçue comme une altération chronique de viscosité sanguine perçue comme une altération de la normale. Enfin, un entraînement sur le long terme conduit à une diminution chronique de viscosité sanguine perçue comme une amélioration de la viscosité sanguine. Dans cette partie nous traiterons des effets d'un exercice aigu ainsi que des effets d'un entraînement prolongé sur la rhéologie sanguine.

VI.1.2.1 EFFET DE L'EXERCICE AIGU SUR LA RHEOLOGIE SANGUINE

Il a été rapporté dans de nombreuses études qu'un exercice physique aigu est accompagné d'une augmentation de la viscosité sanguine, conséquence des changements des propriétés rhéologiques des globules rouges, de l'hématocrite et de la viscosité plasmatique (52, 91, 92, 101, 245). Par contre, cette augmentation de la viscosité sanguine pourrait être prévenue

179

par une hydratation adéquate durant l'effort (276, 389) bien que ce résultat ne soit pas toujours retrouvé (111).

VI.1.2.1.1 IMPLICATION DE LA VISCOSITE PLASMATIQUE DANS L'HYPERVISCOSITE

SANGUINE POST-EXERCICE

L'augmentation de la viscosité sanguine après un exercice aérobie est généralement accompagnée d'une augmentation de la viscosité plasmatique de l'ordre de 10-12% (52, 91) et est causée par une augmentation du nombre de protéines plasmatiques telles que fibrinogène, α 1-globulines, α 2-globulines, β -globulines et γ -globulines (104, 389, 413) ainsi qu'à une perte de volume plasmatique (93).

VI.1.2.1.2 IMPLICATION DE L'HEMATOCRITE SUR L'HYPERVISCOSITE SANGUINE POST-

EXERCICE

L'augmentation de la viscosité sanguine post-exercice est également attribuée à une augmentation de 3-4% de l'hématocrite (91). Cette augmentation de l'hématocrite est causée par de nombreux facteurs tels qu'une diminution du volume plasmatique (sudation, shifts d'eau) (309, 361) et un relargage des globules rouges de réserve par la rate (191, 222).

VI.1.2.1.3 IMPLICATION DE LA DEFORMABILITE ERYTHROCYTAIRE DANS L'HYPERVISCOSITE SANGUINE POST-EXERCICE

L'effet aigu d'un exercice physique conduit généralement à une diminution de la déformabilité érythrocytaire (286, 418). L'augmentation du niveau de lactate pourrait contribuer à ce phénomène en augmentant l'osmolarité locale qui induirait ainsi une déshydratation du globule rouge (231). Cette réduction de la déformabilité érythrocytaire post-exercice pourrait également être attribuée à un relargage de globules rouges plus
rigides par la rate en réponse à une augmentation du débit sanguin dans cet organe (418). Enfin, il n'est pas rare que la déformabilité érythrocytaire continue de diminuer 12 heures après l'effort avant de retourner à la normale dans les 24 heures. Le stress oxydant pourrait être impliqué dans ce phénomène (93, 260, 348, 417).

Néanmoins, cette rigidification des globules rouges n'est pas toujours retrouvée (95). En effet, un certain nombre de travaux ont rapporté au contraire une amélioration de la déformabilité érythrocytaire à l'effort, plus particulièrement chez les athlètes entrainés en endurance (95). Cette observation pourrait être la conséquence de l'effet bénéfique du NO produit lors de l'effort sur la rhéologie du globule rouge (36, 95).

VI.1.2.1.4 IMPLICATION DE L'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE DANS L'HYPERVISCOSITE SANGUINE POST-EXERCICE

Bien que certaines études observent une diminution de l'agrégation érythrocytaire après un exercice aérobie (418), d'autres études rapportent soit une absence de changement de ce paramètre (94, 276, 390) soit une augmentation de ce paramètre (61, 375) qui serait liée à l'augmentation du taux de fibrinogène plasmatique.

VI.1.2.2 EFFET D'UN ENTRAINEMENT PROLONGE SUR LA RHEOLOGIE SANGUINE

Nous avons vu plus haut que les sujets ayant les meilleures aptitudes aérobies ont également une viscosité sanguine et un hématocrite plus faible (59, 143) suggérant un effet rhéo-fluidifiant d'une activité physique quotidienne. D'autre part, il a été montré qu'une activité physique régulière conduisait à une amélioration de la déformabilité érythrocytaire (425).

Ainsi, alors qu'un exercice aigu cause des changements de la rhéologie du sang susceptible d'augmenter les résistances vasculaires, l'entraînement (c'est à dire la répétition d'un exercice aigu dans le temps) améliore le profil hémorhéologique. Cet effet bénéfique est susceptible de diminuer les contraintes hémodynamiques et d'améliorer la perfusion tissulaire. Mais qu'en est-il chez les patients atteints de la drépanocytose ?

VI.2 BALANCE BENEFICES/RISQUES DE L'EXERCICE CHEZ LES PATIENTS

ATTEINTS DE LA DREPANOCYTOSE

Nous avons vu que les patients drépanocytaires connaissent d'importantes altérations hémorhéologiques participant à la physiopathologie de la maladie (Partie II). Or, nous venons de voir que l'exercice physique aigu pouvait également altérer les propriétés hémorhéologiques chez le sujet sain ; ce qui pourrait constituer un risque chez le drépanocytaire. Cependant, l'exercice physique sur le long terme possède de nombreux effets positifs. Ainsi tout l'enjeu est de bien évaluer la balance bénéfices/risques de l'exercice physique chez les patients drépanocytaires.

VI.2.1 RISQUES LIES A L'ACTIVITE PHYSIQUE CHEZ LES PATIENTS DREPANOCYTAIRES

L'exercice physique favorise le relargage d'oxygène par l'hémoglobine S, l'augmentation de la lactatémie, la déshydratation et l'hyperthermie et peut donc précipiter la falciformation des érythrocytes et la survenue de complications chez les patients drépanocytaires (voir I.2.2). Ainsi, le problème auquel sont confrontés les professionnels de la santé est de savoir quel(s) type(s) d'activité(s) physique(s) peut(vent) être recommandé(s) et cela pour quel type de patient.

Il a été montré que la présence de l'anémie hémolytique chronique est à l'origine d'un premier seuil ventilatoire plus bas chez les patients drépanocytaires (71). L'augmentation de la lactatémie apparaît chez ces patients pour des intensités d'exercice plus faibles qu'une population contrôle et augmente de ce fait le risque de survenue d'une crise vaso-occlusive. En outre, bien qu'un exercice physique puisse améliorer la fonction immune, un exercice

aigu peut l'altérer et conduire à une augmentation du taux de cytokines circulantes (149, 320). Ces cytokines sont à même d'activer les cellules circulantes ainsi que de nombreuses molécules d'adhérences, et ainsi favoriser la survenue d'une crise vaso-occlusive (241). Ces phénomènes inflammatoires sont particulièrement exacerbés lorsque des dommages sont causés aux muscles (320) comme dans le cas d'exercices excentriques. Les sports de contact sont aussi à éviter chez les drépanocytaires car ils peuvent conduire à une rupture de la rate, notamment chez les patients atteints de splénomégalies (192). D'autre part, une étude de Platt a montré que l'exercice intense pouvait conduire à une hémoglobinurie extrême chez le drépanocytaire (306). Dans cette étude, il rapporte le cas d'un sujet sportif drépanocytaire homozygote SS chez qui l'urine devenait rougeâtre souvent après ses matchs de basketball ou sa pratique du karaté (306). Dans cette étude, Platt montre que cette hémolyse massive est causée par une fragilité accrue des érythrocytes rigides soumis à des contraintes de cisaillement importantes (Figure 71) (306). Enfin, Campbell et collaborateurs ont rapporté que 8% des patients drépanocytaires connaissent une hypoxémie induite par l'exercice (*c.-à-d.* définie comme une chute de SpO2 \geq 3%) lors d'un test de marche de 6 minutes (72) susceptible d'aggraver leur hypoxémie observée au repos (72, 234). Cette hypoxémie, si elle est sévère, est susceptible aussi d'amorcer le phénomène de polymérisation de l'hémolobine S conduisant à la falciformation des globules rouges.

Ainsi les activités intenses et traumatisantes d'un point de vu mécanique seraient à éviter pour la population drépanocytaire. Il reste donc à trouver une modalité d'effort qui ne soit pas dangereuse pour les patients drépanocytaires et qui dans le même temps puisse solliciter suffisamment l'organisme pour engendrer des adaptations bénéfiques.



Figure 71. Hémolyse en fonction des contraintes de cisaillement ("shear stress") chez des sujets contrôle (o), drépanocytaires SC (Δ) et drépanocytaires SS (x). D'après (306).

VI.2.2 BENEFICES LIES A L'ACTIVITE PHYSIQUE CHEZ LES PATIENTS DREPANOCYTAIRES

Quelques rares études rapportent que certains types d'activités ne présentent pas de danger ou présenteraient même des effets bénéfiques pour les patients drépanocytaires (8, 20, 25, 371).

Alcorn et collaborateurs ont montré qu'une thérapie associant traitement à la chaleur ("fluidotherapy") et exercice diminuait le temps d'hospitalisation chez les enfants drépanocytaires suite à une crise vaso-occlusive douloureuse (8). Les exercices étaient proposés une fois la douleur passée et comprenait la réalisation d'exercice modéré de force et d'endurance (*c.-à-d.* "gymnastique récréationelle", ergocycle et jeux) d'une durée comprise entre 10 et 30 minutes (8). Mais peu d'informations sont données sur l'intensité d'effort. Plus récemment, Tinti et collaborateurs ont rapporté le cas d'une patiente drépanocytaire SS de 32 ans à qui ils ont proposé une thérapie aquatique dans de l'eau chaude (371). Les exercices consistaient à la réalisation d'exercices dans de l'eau chaude ainsi que la réalisation d'étirements, d'exercices aérobies et de relaxation. La durée de la 184

séance était de 45 minutes à raison de 2 fois par semaines sur une durée totale de 5 semaines (371). Les auteurs rapportent une diminution de la douleur ressentie par le patient, une amélioration de la force des muscles respiratoires et une amélioration de la qualité de vie de la patiente (371). De nouveau, très peu d'informations sur les intensités d'effort, ce qui rend difficile la généralisation de ce genre d'approche.

Une étude de Barbeau et collaborateurs a rapporté également des effets positifs de l'exercice physique chez dix patientes drépanocytaires SS (25). L'exercice a été réalisé sur ergocycle par les patients à 70% de la fréquence cardiaque maximale durant 30 minutes et cela trois jours consécutifs. Les auteurs n'ont pas observé de réponse inflammatoire à l'exercice. En revanche, les auteurs ont rapporté une augmentation de la concentration des métabolites du NO avec la répétition des efforts. Ainsi, ce type d'exercice physique pourrait avoir un effet bénéfique sur la vasomotricité des patients drépanocytaires. Enfin, une étude récente de Balayssac-Syransy et collaborateurs a montré qu'un exercice physique réalisé sur ergocycle à une intensité de 43 Watt (soit environ 50% de leur puissance maximale) durant 20 minutes n'entraînait qu'une modification modérée des paramètres hématologiques et hémorhéologiques sans risque de déclenchement de crise vaso-occlusive (20).

Il est cependant à noter que ces études ne définissent pas de manière individualisée l'intensité d'effort. En effet, il a été montré que le seuil anaérobie était compris entre 35 et 60% de la VO_{2max} chez les patients drépanocytaire SS (13, 71). Ainsi, dans l'étude de Barbeau et collaborateurs (25), la quasi-totalité des patients pourrait être au-dessus de leur premier seuil ventilatoire et dans l'étude de Balayssac-Syransy et collaborateurs (20) certains patients se situaient très probablement au-dessus, comme le suggère la dérive de la ventilation observée à l'effort chez les patients drépanocytaires dans cette étude.

Il est donc à noter que des exercices dont l'intensité est légère et dont la durée n'excède pas les 30 minutes pourraient avoir des effets positifs chez les patients drépanocytaires. Cependant, aucune information quand à l'intensité optimale d'exercice, d'un point de vue de 185 la balance bénéfiques/risques, n'est disponible dans la littérature (96). Les altérations hémorhéologiques jouant un rôle central dans la physiopathologie de la maladie (220, 225, 270), nous avons testé dans l'étude n°1 les effets d'un exercice aigu conduit jusqu'au premier seuil ventilatoire (pour éviter des changements métaboliques trop sévères et potentiellement dangereux) sur la rhéologie du sang. Un événement vaso-occlusif étant susceptible de survenir plusieurs heures / jours après la réalisation d'un effort, nous avons également suivi le profil hémorhéologique après l'effort jusqu'à 60 heures après la sollicitation physiologique.

C. CONTRIBUTION PERSONNELLE

VII. PROBLEMATIQUE ET HYPOTHESES GENERALES DE LA THESE

Comme nous l'avons vu dans la partie consacrée à la revue de la littérature, les patients atteints de la drépanocytose sont caractérisés par altérations hématologiques et hémorhéologiques (23, 100, 220, 225, 270, 374). D'autre part, les études portant sur des modèles animaux, de la modélisation mathématique ou encore sur des sujets sains, montrent que ces altérations hématologiques et hémorhéologiques favorisent la survenue d'une hypoxémie artérielle au repos (183), d'une l'hypoxémie induite par l'exercice (91, 92, 183) ainsi que des troubles hémodynamiques (31, 33, 34, 37, 66, 86, 174, 358, 376, 377, 410, 419) et de la perfusion tissulaire en oxygène (93, 292, 333).

Ces altérations hématologiques et hémodynamiques sont provoquées par le phénomène de polymérisation de l'hémoglobine S causé par la désoxygénation de l'hémoglobine, l'hyperthermie, la diminution du pH ainsi que la déshydratation du globule rouge. Or, tous ces processus sont favorisés lors d'une activité physique. Ce constat explique la contrindication médicale que représente l'activité physique chez les patients atteints de la drépanocytose. Néanmoins, dans le même temps, nous avons vu (partie VI) qu'une activité physique régulière améliore les paramètres hémorhéologiques chez le sujet sain (59, 143, 425). Dans ce sens, quelques rares études suggèrent que l'entraînement physique régulier pourrait avoir des effets bénéfiques chez les patients drépanocytaires (10, 25, 371). Cependant, l'intensité de la pratique à recommander reste encore mal définie.

Ainsi les objectifs de ce travail de thèse étaient de 1) définir une intensité d'exercice qui ne présente pas de risque pour les patients atteints de la drépanocytose, 2) de tester si les altérations hématologiques et hémorhéologiques sont impliquées, chez les patients drépanocytaires, dans l'hypoxémie artérielle de repos, l'hypoxémie induite par l'exercice ainsi que dans les troubles de l'hémodynamique et de la perfusion tissulaire en oxygène.

Afin d'apporter des réponses à ces objectifs, nous avons mené plusieurs études :

- Etude n°1. Dans la partie VI.2.1, nous avons vu que les risques de complications à l'exercice sont augmentés par une activité physique intense entraînant une diminution du pH et une hyperthermie ainsi qu'avec des activités physiques excentriques et/ou traumatisantes d'un point de vu mécanique. L'enjeu est donc de trouver une modalité de pratique sollicitant suffisamment l'organisme du patient drépanocytaire pour permettre des adaptations sans pour autant majorer le risque de survenue de complications aigues. C'est pourquoi, nous avons posé l'hypothèse qu'une activité physique réalisée sur ergocycle (*c.-à-d.* activité non traumatisante) jusqu'au premier seuil ventilatoire (*c.-à-d.* pour éviter une diminution trop importante du pH et une désoxygénation de l'hémoglobine) ne devrait pas exacerber les altérations hématologiques et hémorhéologiques chez les patients drépanocytaires à la fin de l'effort ainsi que 12, 36 et 60 heures après.
- Etude n°2 : La littérature ainsi que notre étude n°1 rapportent la présence d'une hypoxémie de repos et d'exercice chez les patients atteints de la drépanocytose (voir partie III.2). Ces études se sont intéressées à l'implication des paramètres hématologiques dans cet état hypoxémique. Cependant, dans la partie IV.3 nous avons vu que les altérations hémorhéologiques pourraient également être impliquées. Nous avons donc testé les associations entre le profil hémorhéologique

des patients drépanocytaires et la présence d'une hypoxémie de repos/d'exercice dans une population pédiatrique de patients drépanocytaires.

Etudes n°3 et 4 : La présence d'anomalies hémorhéologiques est susceptible de perturber l'hémodynamique et la perfusion tissulaire en oxygène (voir partie V). Les patients drépanocytaires sont caractérisés par la présence de perturbations hémorhéologiques sévères, ainsi que par des anomalies de l'oxygénation tissulaire. Cependant, le lien entre ces deux phénomènes n'a jamais été testé dans le cadre de la drépanocytose. Nous avons donc posé l'hypothèse que ces troubles de l'oxygénation tissulaire au niveau cérébral (étude n°3) et musculaire (étude n°4) pourraient être associés aux altérations hémorhéologiques. Nous avons également étudié et quantifié le vasomotion et flowmotion dans ces deux études.

VIII. LISTE DES PUBLICATIONS

VIII.1 PUBLICATIONS PRINCIPALES

<u>Etude N°1</u> : Delayed beneficial effect of a single short physical exercise conducted to the first ventilatory threshold on the red blood cell agregate strength in patients with sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc* ; 2012, 52 (1): 15-26. IF: 3.398

X. Waltz, M. Hedreville, S. Sinnapah, Y. Lamarre, V. Soter, N. Lemonne, M. Etienne-Julan, E. Beltan, T. Chalabi, R. Chout, O. Hue, D. Mougenel, M.D. Hardy-Dessources, P. Connes.

<u>Etude N°2</u> : Hematological and hemorheological determinants of steady-state and exerciseinduced hypoxemia in SCD patients. *A soumettre*.

<u>Xavier Waltz</u>, Marie-Laure Lalanne-Mistrih, Marc Romana, Roberto Machado, Yann Lamarre, Vanessa Tarer, Benoît Tressières, Lydia Diavialle-Doumdo, Marie Petras, Frederic Maillard, Marie-Dominique Hardy-Dessources, Maryse Etienne-Julan, Philippe Connes.

<u>Etude N°3</u>: Hemorheological alterations, decreased cerebral microvascular oxygenation and cerebral vasomotion compensation in sickle cell patients. *American Journal of hematology ;* 2012, 87(12): 1070-1073. IF: 4.671

X. Waltz, A. Pichon, D. Mougenel, N. Lemonne, M.L Lalanne-Mistrih, S. Sinnapah, V. Tarer, B. Tressières, Y. Lamarre, M. Etienne-Julan, O. Hue, M.D Hardy-Dessources, P. Connes.

<u>Etude N°4</u>: Muscle oxygen consumption is normal in sickle cell disease despite reduced muscle microvascular oxygenation and hemorheological abnormalities. *Plos One.* IF: 4.092
 <u>X. Waltz</u>, A. Pichon, D. Mougenel, N. Lemonne, M.L Lalanne-Mistrih, V. Tarer, B. Tressières, Y. Lamarre, M. Etienne-Julan, O. Hue, M.D Hardy-Dessources, P. Connes.

VIII.2 PUBLICATIONS SECONDAIRES

Overweight explains the increased red blood cell aggregation in patients with obstructive sleep apnea. *Clin hemorheol Microcirc*; sous presse. IF : 3.398 S. Sinnapah, G. Cadelis, X.Waltz, Y. Lamarre and P.Connes.

Severe proliferative retinopathy is associated with blood hyperviscosity in sickle cell hemoglobin-C disease but not in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc* ; sous presse. IF: 3.398

C. Lemaire, Y. Lamarre, N. Lemonne, <u>X. Waltz</u>, S. Chahed, F. Cabot, I. Botez, B. Tressieres, M-L. Lalanne-Mistrih, M. Etienne-Julan and P. Connes.

Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease. *Haematologica*; 2012, 97(11): 1641-7. IF: 6.424
Y. Lamarre, M. Romana, <u>X. Waltz</u>, M.L. Lalanne-Mistrih, B. Tressieres, L. Divialle-Doumdo, M.D. Hardy-Dessources, J. Vent-Schmidt, M. Petras, C. Broquere, F. Maillard, V. Tarer, M. Etienne-Julan, and P. Connes.

Blood viscosity and hemodynamics at exercise. *Clin Hemorheol Microcirc ;* 2012, 51 (2) : 101-9. IF: 3.398

P. Connes, A. Pichon, M. D. Hardy-Dessources, <u>X. Waltz</u>, Y. Lamarre, M. J. Simmonds and J. Tripette.

VIII.3 COMMUNICATIONS ORALES

Hemorheological alterations, decreased cerebral microcrovascular oxygen saturation and cerebral vasomotion in sickle cell patients. 14th International Congress of Biorheology and 7th International Conference on Clinical Hemorheology. 4-7 July 2012, Istanbul, Turkey. <u>X Waltz</u>, A Pichon, D Mougenel, N Lemonne, ML Lalanne-Mistrih, S Sinnapah, V Tarer, B Tressières, Y Lamarre, M Etienne-Julan, O Hue, MD Hardy-Dessources, P Connes.

Relationships between hemorheological alterations and impaired cerebral microcirculatory oxygenation in sickle cell disease. 2ème conférence caribéenne sur la drépanocytose (27-30 novembre, 2011, Guadeloupe).

<u>X Waltz</u>, D Mougenel, N Lemonne, ML Lalanne-Mistrih, A Pichon, S Sinnapah, V Tarer, B Tressières, Y Lamarre, M Etienne-Julan, O Hue, MD Hardy-Dessources, P Connes.

Relation entre troubles de la rhéologie sanguine et altérations de l'oxygénation de la microcirculation cérébrale et musculaire chez le patient drépanocytaire. Congrès de la Société Française d'Hématologie (10-12 Mars, 2011, Paris).

X Waltz, S Sinnapah, ML Lalanne-Mistrih, D Mougenel, N Lemonne, Y Lamarre, MD Hardy-Dessources, B TRessieres, O Hue, M Etienne-Julan, P Connes.

IX. MATERIELS ET METHODES

IX.1 ASPECTS REGLEMENTAIRES ET FINANCEMENTS

Les quatre études présentées dans cette thèse ont toute été approuvées par le Comité d'Éthique local du Centre Hospitalier Universitaire de Pointe-à-Pitre et le comité de protection des personnes régional Sud-Ouest Outre-Mer III, Bordeaux, France. Les sujets (et leurs parents pour l'étude n°2) étaient informés quant aux procédures et aux objectifs des différentes études. Les protocoles ont été conçus et appliqués en accord avec les recommandations de la déclaration d'Helsinki.

L'étude n°1 (projet SNAD sur lequel était également étudiée l'activité du système nerveux autonome ; SNA) a été financée par le CHU de Pointe-à-Pitre (appel d'offre local) à hauteur de 17 500 €. L'étude n°2 représente une partie du projet SAPOTILLE qui a été financé par un PHRC inter-régional à hauteur de 180 000 €. Les études n°2 et n°3 (projet SPIR) ont été financées par le CHU de Pointe-à-Pitre (appel d'offre local) à hauteur de 15 000€.

IX.2 POPULATION ETUDIEE

IX.2.1 ETUDE N°1

Caractéristiques des sujets : 8 patients de génotype SS (4 hommes / 4 femmes, âge : 33,6 \pm 3,6 ans, poids : 61,4 \pm 4,5 kg, taille : 171,8 \pm 2,9 cm, HbS : 85,8 \pm 1,8 % et hémoglobine fœtale : 6.7 \pm 1.8 %) ainsi que 13 sujets contrôles de génotype AA (7 hommes / 6 femmes, âge : 34,9 \pm 2,1 ans,poids : 77,3 \pm 3,6 kg et taille : 173,9 \pm 2,3 cm).

Critères d'inclusion :

- Âgés entre 18 et 50 ans, sans critère de sexe
- Origine Afro-Caribéenne

- Affiliés ou bénéficiaires d'un régime de sécurité sociale
- Consentement éclairé et signé obtenu
- Résidant en Guadeloupe
- Patients de génotype AA et SS diagnostiqués au laboratoire du Centre référent labellisé pour la prise en charge de la Drépanocytose (Centre Caribéen de la Drépanocytose)
- Les patients SS devaient être en état stable et devaient être considérés comme « non sévères ». Etaient considérés comme sévères, les patients drépanocytaires qui avaient présenté au cours des cinq dernières années :
 - plus de 3 hospitalisations par an pour crise douloureuse vaso-occlusive et/ou
 - plus de 2 syndromes thoraciques aigus par an et/ou
 - un accident vasculaire cérébral et/ou
 - au moins un passage en service de réanimation et/ou
 - au moins une transfusion par an.

Critères d'exclusion :

- Autres hémoglobinopathies que celles étudiées (plus particulièrement celles liées à la présence d'hémoglobine D et l'α-thalassémie et la β-thalassémie).
- Troubles du rythme cardiaque
- Hypertension artérielle pulmonaire sévère
- Pace Maker cardiaque
- Tabagisme
- Diabète I et II
- Traitement antiarythmique cardiaque traitements médicaux modifiant l'activité du SNA : α et β bloquants, sympathomimétiques, atropiniques, …

- Obésité morbide (BMI supérieur à 30)
- Grossesse, le post -partum, l'allaitement
- Traitement par hydroxyurée
- Transfusion ou saignée récente (moins de 3 mois avant le début du protocole).

IX.2.2 ETUDE N°2

Caractéristiques des sujets : 107 enfants atteints de la drépanocytose dont 50 sujets SC (29 garçons et 21 filles) et 57 sujets SS (28 garçons et 29 filles) ont été recrutés. Ces patients représentent 92% de la cohorte pédiatrique d'enfants atteints de la drépanocytose âgés entre 8 et 16 ans et suivis régulièrement depuis la naissance par l'unité de pédiatrie du CHU de Pointe-à-Pitre.

- Caractéristiques des sujets SC : âge : 12,0 ± 2,3 ans ; α-thalassémie : 34 % du groupe ; Hémoglobine fœtale : 2,8 ± 2,8 %.
- Caractéristiques des sujets SS : âge : 11,5 ± 2,3 ans ; α-thalassémie : 39,3 % du groupe ; Hémoglobine fœtale : 8,5 ± 6,4 %; Traitement à l'Hydroxyurée : 21,1 % du groupe.

Critères d'inclusion :

- âgés entre 8 et 16 ans.
- syndrome drépanocytaire majeur SS ou SC diagnostiqué en période néonatale dans les laboratoires du Centre référent pour la prise en charge de la Drépanocytose (Centre Caribéen de la Drépanocytose et Centre Hospitalier du Lamentin (CHL)) ou d'autres centres labellisés.
- cliniquement à l'état de base au moment des mesures : à plus d'un mois de toute complication et de 3 mois de toute transfusion

- suivis au Centre Caribéen de la drépanocytose "Guy Mérault" ou dans le service de pédiatrie/Centre Intégré de la Drépanocytose du CHL ou dans le service de Pédiatrie du CHU de Fort de France.
- résidant en Guadeloupe ou en Martinique
- affiliés ou bénéficiaires d'un régime de sécurité sociale.
- dont le consentement éclairé a été obtenu au niveau des enfants les plus âgés et des parents

Critères d'exclusions :

- autres hémoglobinopathies.
- traitement par protocole transfusionnel ou tout traitement influençant potentiellement
 l'hémorhéologie des patients (en dehors du traitement par hydroxyurée)
- transfusion ou saignée récente (moins de 3 mois avant le début du protocole)
- parents ou enfants n'ayant pas donné leur accord pour la participation à l'étude
- parents non affiliés à un régime de sécurité sociale

$\mathsf{IX.2.3}\:\mathsf{ETUDE}\:\mathsf{N}^\circ\mathsf{3}$

Caractéristiques des sujets : 62 sujets Afro-caribéens, appariés pour l'âge, ont été recrutés dans cette étude à savoir 20 sujets contrôles de génotype AA (10 hommes / 10 femmes), 21 sujets drépanocytaires de génotype SC (10 hommes et 11 femmes) ainsi que 21 patients drépanocytaires de génotype SS (11 hommes et 10 femmes).

Caractéristiques des sujets AA : âge : 34,7 ± 11,9 ans ; poids : 75,4 ± 14,6 Kg ; taille : 174,6 ± 9,6 cm ; Hémoglobine fœtale : 0,6 ± 0,7 %.

- Caractéristiques des sujets SC : âge : 35,9 ± 12,2 ans ; poids : 68,7 ± 16,2 Kg ; taille : 169,0 ± 12,6 cm ; Hémoglobine fœtale : 1,3 ± 0,9 % ; Hémoglobine C : 43,4 ± 1,3 % ; Hémoglobine S : 47,4 ± 0,9 %.
- Caractéristiques des sujets SS : âge : 33,6 ± 11,9 ans ; poids : 63,2 ± 9,7 Kg ; taille :
 170,0 ± 8,4 cm ; Hémoglobine fœtale : 7,6 ± 5,4 % ; Hémoglobine S : 83,6 ± 5,7 %.

Critères d'inclusion :

- adultes d'âge > 18 ans au moment de l'inclusion
- syndrome drépanocytaire majeur connu (électrophorèse/HPLC) de type homozygote
 SS ou hétérozygote composite SC
- sujets contrôles non drépanocytaires et sans pathologie associée
- diagnostic de drépanocytose en période néonatale dans les laboratoires de référence pour le diagnostic des hémoglobinopathies (Centre référent labellisé pour la prise en charge de la Drépanocytose, Unité transversale de Drépanocytose du CHU de Pointe-à-Pitre et Centre Hospitalier du Lamentin, laboratoires d'île de France, autres)
- accord de participation à l'étude par consentement écrit, éclairé et signé du patient.
- cliniquement à l'état de base au moment des mesures
- suivis à l'Unité transversale de Drépanocytose du CHU de Pointe-à-Pitre
- résidant en Guadeloupe
- affiliés ou bénéficiaires d'un régime de sécurité sociale.

Critères d'exclusion :

- autre hémoglobinopathie
- antécédent et/ou IRM montrant des signes d'accident vasculaire cérébral, ou de vasculopathie cérébrale ou d'infarctus silencieux

- épisode infectieux récent (de moins d'1 mois)
- traitement par protocole transfusionnel, par hydroxyurée ou tout traitement modifiant potentiellement les caractéristiques hémorhéologiques du sang (de moins de 3 mois)
- transfusion ou saignée récente (moins de 3 mois avant le début du protocole)
- non affilié à un régime de sécurité sociale
- grossesse, allaitement
- patient déjà engagé dans un protocole de recherche pouvant modifier les paramètres rhéologiques du sang
- patients non compliants à la prise en charge habituelle
- patients incapables majeurs, ne pouvant exprimer leur consentement
- sujets contrôles non drépanocytaires malades
- sujets présentant un pli cutané ≥ 1,5 cm au niveau du muscle fléchisseur superficiel des doigts (soit 7,5 mm d'épaisseur de peau + tissu adipeux).

IX.2.4 ETUDE N°4

Caractéristiques des sujets : L'étude n°4 porte sur la même population que l'étude n°3. Cependant, les mesures de la VO₂ musculaire et du débit sanguin musculaire utilisent les valeurs d'oxyghémoglobine et de désoxyhémoglobine mesurées à l'aide du spectroscope dans le proche infrarouge et calculées par l'appareil à l'aide de la méthode de Beer-Lambert modifiée. Ces données sont donc sensibles à l'épaisseur du pli cutané (385) (voir partie IX.3.3). Les sujets ont donc été sélectionnés afin d'obtenir des groupes avec un âge et une épaisseur du pli cutané comparables. Pour cette raison, l'analyse statistique n'a porté que sur 52 sujets à savoir 16 sujets contrôles de génotype AA (9 hommes et 7 femmes), 20 patients drépanocytaires de génotype SC (10 hommes et 10 femmes) ainsi que 16 patients drépanocytaires de génotype SS (8 hommes et 8 femmes).

- Caractéristiques des sujets AA : âge : 34,6 ± 12,5 ans ; poids : 73,8 ± 13,4 Kg ; taille : 176,3 ± 9,6 cm ; Hémoglobine fœtale : 0,4 ± 0,6 % ; épaisseur du pli cutané : 3,2 ± 1,0 mm.
- Caractéristiques des sujets SC : âge : 35,5 ± 12,3 ans ; poids : 67,7 ± 16,0 Kg ; taille : 168,8 ± 13,0 cm ; Hémoglobine fœtale : 1,2 ± 0,8 % ; Hémoglobine C : 43,4 ± 1,3 % ; Hémoglobine S : 47,4 ± 0,9%, épaisseur du pli cutané : 3,1 ± 1,3 mm.
- Caractéristiques des sujets SS : âge : 32,9 ± 13,5 ans ; poids : 64,3 ± 10,3 Kg ; taille : 170,0 ± 8,6 cm ; Hémoglobine fœtale : 6,8 ± 5,6 % ; Hémoglobine S : 83,8 ± 6,1 %, épaisseur du pli cutané : 2,8 ± 1,4 mm.

Critère d'inclusion et d'exclusion : idem que pour l'étude n°3

IX.3 MATERIELS ET METHODES HEMATOLOGIQUES (ETUDES N°1, 2, 3 ET 4)

IX.3.1 LA NUMERATION FORMULE SANGUINE, RETICULOCYTES ET PLAQUETTES

La numération formule sanguine + réticulocytes + plaquettes a été réalisée à l'aide d'un compteur hématologique (Max M-Retic, Coulter, USA) dans les 24 heures après le prélèvement sanguin sur tube EDTA.

IX.3.2 MESURE DE L'HEMATOCRITE

Après avoir homogénéisé le tube EDTA prélevé, le sang natif est placé dans deux tubes capillaires de 50 μL (mesure en duplicata). Ces tubes sont ensuite microcentrifugés pendant 10 min à 9500 g pour séparer les éléments figurés du plasma.

Le pourcentage d'éléments figurés est ensuite obtenu à l'aide d'une réglette prévue à cet effet (Hawksley micro-Hematocrit Reader) (Figure 72).



Figure 72. Réglette de mesure de l'hématocrite (Hawksley micro-Hematocrit Reader).

IX.2 MATERIELS ET METHODES HEMORHEOLOGIQUES (ETUDES $N^{\circ}1, 2, 3$ et

4)

IX.2.1 LE PRELEVEMENT SANGUIN

Afin de respecter le nouveau guide international des bonnes pratiques en hémorhéologie (29), les prélèvements sanguins ont été réalisés après une période de 10 minutes de repos en position assise au niveau de la veine antécubitale. Une fois le garrot placé au niveau du bras, le prélèvement est effectué dans les 90 secondes, sur tube EDTA, sans que le garrot ne soit retiré avant la fin du prélèvement (98, 102).

IX.2.2 ANALYSE ET OXYGENATION DE L'ECHANTILLON

Pour l'ensemble des paramètres hémorhéologiques, les mesures ont été réalisées dans les 4 heures après le prélèvement sanguin (tube EDTA). Le sang a été oxygéné durant une période minimum de 10 minutes dans un tube dont le volume est au moins 20 fois supérieur au volume de sang qu'il contient comme le préconise le nouveau guide international des bonnes pratiques en hémorhéologie (29). L'oxygénation des tubes est indispensable chez les patients drépanocytaires dont l'HbS polymérise lorsque la saturation en O₂ diminue (29).

IX.2.3 LA VISCOSITE SANGUINE

La viscosité sanguine a été mesurée à l'aide d'un viscosimètre cône-plan (Brookfield, modèle LVDV-II+PRO, cône CPE 40) (Figures 73 et 74). Le viscosimètre cône-plan comprend une surface fixe (le plan), une surface mobile (le cône) et un axe sur lequel se fixe le cône. L'axe comprend un ressort et enregistre la résistance (*c.-à-d.* la contrainte de cisaillement - τ) exercée par le sang sur le cône. Avant toute mesure la force exercée par le cône (en l'absence de sang) est calibrée ainsi que la distance, e, entre le plan et le cône (l'entrefer). Ainsi l'appareil peut calculer la vitesse de cisaillement γ à partir de la vitesse de rotation V choisie pour la mesure (*c.-à-d.* γ = V/e, voir partie II et Figure 74). Ainsi, à partir de la contrainte de cisaillement exercée par le sang sur l'axe et de la vitesse de cisaillement, l'appareil nous donne la viscosité sanguine (voir partie II).



Figure 73. Viscosimètre cône-plan Brookfield, modèle LVDV-II+PRO



Figure 74. Principe de fonctionnement du viscosimètre cône-plan. Voir texte ci-dessus.

Les mesures de viscosités ont été réalisées sur du sang à hématocrite natif à 3 vitesses de cisaillements différentes à savoir 45, 90 et 225 s⁻¹. Le sang étant un fluide thixotropique la vitesse de rotation du cône a été augmentée de manière croissante et chaque valeur de viscosité a été notée après 30 secondes de rotation du disque afin d'obtenir des valeurs stables.

Les limites de cette technique de mesure in vitro sont que :

- la viscosité est mesurée à température ambiante et non à 37°C

les valeurs pour des vitesses inférieures à 45 s⁻¹ sont moins précises. Ainsi,
 l'influence de l'agrégation érythrocytaire sur les valeurs de viscosité sanguine n'est pas mesurée.

IX.2.4 MESURE DE DEFORMABILITE ERYTHROCYTAIRE PAR EKTACYTOMETRIE (LASER ASSISTED OPTICAL ROTATIONAL CELL ANALYZER, LORCA).

La déformabilité érythrocytaire ainsi que les paramètres d'agrégation érythrocytaire (voir plus loin) ont été mesurés à l'aide du LORCA (Figure 75). Il s'agit d'un système couette comprenant deux cylindres : un cylindre fixe au centre et un cylindre mobile à l'extérieur. Ces deux cylindres définissent un espace appelé entrefer dans lequel est placée la suspension (globules rouges en tampon ou sang total). La vitesse de rotation du cylindre mobile définit les contraintes de cisaillement appliquées à la suspension étudiée dont la viscosité est connue (pour la mesure de la déformabilité érythrocytaire).



Figure 75. Laser Assisted Optical Rotational Cell Analyzer, LORCA

La déformabilité érythrocytaire a été mesurée par ektacytométrie (LORCA) à 9 contraintes de cisaillement comprises entre 0,3 et 30 Pa afin d'obtenir une courbe de déformabilité (Figure 76).



Figure 76. Courbe de déformabilité ("EI") en fonction des contraintes de cisaillement ("shear stress"). A gauche la courbe d'un sujet contrôle de génotype AA à droite la courbe d'un patient drépanocytaire de génotype SS.

Avant de démarrer les mesures, une suspension de sang oxygéné est mélangée à une solution de *PolyVinylPyrrolidone* (PVP), à une concentration de 2 µL de globule rouge par mL de PVP (*c.-à-d.* soit un hématocrite de 0,2 %) (29). Le PVP est utilisé comme un fluide tampon dont on connait la viscosité qui est généralement de 30 mPa. Il est nécessaire de connaître la viscosité du PVP afin d'ajuster la vitesse de rotation du cylindre extérieur pour générer les contraintes de cisaillement désirées. Ensuite, 1 mL de cette solution est placé dans l'entrefer (Figure 77). Les mesures sont démarrées quand la suspension atteint une température de 37°C.

Techniquement l'ektacytomètre comprend un laser situé dans le cylindre central statique qui émet une lumière, à 670 nm de longueur d'onde, qui traverse la suspension de sang diluée dans le PVP. Les globules rouges situés dans la suspension vont alors partiellement

diffracter la lumière laser. Lorsque les contraintes de cisaillement sont augmentées (par une augmentation de la vitesse de rotation du cylindre externe), les érythrocytes se déforment et modifient le pattern de diffraction. Ce pattern de diffraction est projeté sur un écran et enregistré par une caméra (Figure 77 et 78) et permet d'obtenir un indice d'élongation (El ou elongation index) qui est donné en fonction de la moitié de la largeur (b) et de la longueur (a) moyenne de l'ellipse se superposant au pattern de diffraction laser des globules rouges (Figure 77 et 78) :

$$EI = (a-b)/(a+b)$$

Plus l'indice El est important, plus la déformabilité érythrocytaire est importante. A noter que l'El mesuré à faible et moyenne contrainte de cisaillement (< 3 Pa) reflète plutôt les propriétés de déformabilité de la membrane alors que les valeurs d'El obtenues à forte contrainte de cisaillement (30 Pa) dépendent fortement de la viscosité interne des globules rouges et du ratio surface/volume des érythrocytes (84).

Cette technique a comme principale limite de ne donner qu'une valeur de déformabilité moyenne, or la déformabilité érythrocytaire dépend de la population érythrocytaire étudiée (*c.-à-d.* réticulocytes, discocytes jeunes, denses et drépanocytes irréversibles). Néanmoins des travaux en cours montrent qu'un traitement optique et mathématique de l'image pourrait permettre de discerner les sous populations érythrocytaires avec cette technique (363).



Figure 77. Principe de l'ektacytométrie (voir texte ci-dessus). Viscous blood dilution = solution de sang dilué dans le PVP, surface mirror = miroir, static inner cylinder = cylindre statique, rotating outer cylinder = cylindre en rotation, projection screen = écran de projection.



Figure 78. Pattern de diffraction enregistré par la caméra de l'ektacytomètre. Les deux images du dessus représentent le pattern de diffraction observé par la caméra en l'absence de contrainte de cisaillement. Sur les deux images du centre, on observe le pattern de diffraction à 30 Pa pour des érythrocytes normaux. Tous les érythrocytes sont orientés dans le sens du flux. Enfin, les deux images du bas montrent le pattern de diffraction mesuré à 30 Pa mais pour du sang contenant 25% d'érythrocytes rigides. Ces érythrocytes ne s'orientent pas dans le sens du flux, d'où le pattern de diffraction en forme de losange ("diamond pattern" caractéristique des patients drépanocytaires SS généralement).

IX.2.5 AGREGATION/DESAGREGATION ERYTHROCYTAIRE PAR REFLEXION LASER

(LORCA)

L'agrégation et la désagrégation érythrocytaire sont mesurées à 37°C après avoir ajusté l'hématocrite à 40% car le niveau d'hématocrite influence fortement l'agrégation érythrocytaire. L'expérimentateur insère 1 mL de sang dans l'entrefer du LORCA.

IX.2.5.1 AGREGATION ERYTHROCYTAIRE

L'agrégation des globules rouges a été obtenue par syllectométrie (*c.-à-d.* mesure de la réflexion de la lumière laser au cours du temps) (Laser Assisted Optical Rotational Cell Analyzer, LORCA). L'agrégation érythrocytaire mesurée ainsi rend compte de la vitesse d'agrégation érythrocytaire.

Le laser contenu dans le cylindre fixe envoie une lumière qui est réfléchie par les globules rouges situés dans l'entrefer (Figure 79). La lumière réfléchie est ensuite collectée par deux photodiodes situées à l'intérieure du cylindre fixe et est convertie en un signal électrique (Figure 79). La variation de l'intensité de la lumière réfléchie variant avec la taille des agrégats renseignent sur le processus dynamique de formation des agrégats érythrocytaires.



Figure 79. Mécanisme utilisé par le LORCA pour la mesure de l'agrégation et de la désagrégation érythrocytaire. Le sang ("whole blood") est placé entre un cylindre fixe ("bob") et un cylindre mobile ("cup"). La lumière laser est réfléchie par le sang sur les phodiodes ("photo diodes") placé dans le cylindre statique ("bob").

Lors de la mesure, 4 étapes peuvent être distinguées (Figure 80):

- Dans un premier temps le cylindre mobile se met à tourner rapidement (*c.-à-d.* forte vitesse de cisaillement; 800 s⁻¹) pour séparer les agrégats érythrocytaires préexistants. On observe un plateau de la lumière réfléchie par les globules rouges qui sont déformés et alignés dans le sens du flux.
- Dans un second temps, la rotation du cylindre externe cesse et les globules rouges reprennent leur forme de repos ce qui conduit à une augmentation de la lumière réfléchie et à l'apparition d'un pic d'intensité sur le syllectogramme. Cette phase renseigne sur l'élasticité membranaire des globules rouges mais est rarement exploitée sauf lorsqu'on resuspend les érythrocytes dans un tampon standard (Hepes ou PBS par exemple) qui permettra de normaliser la viscosité du fluide de

suspension : ce qui n'est pas le cas lorsqu'on travaille avec du sang total ; condition qui reflète mieux l'état physiologique d'un patient.

- Dans une troisième étape, l'agrégation érythrocytaire démarre en l'absence de vitesse de cisaillement. Durant cette étape, on observe l'apparition de rouleaux (*c.-à-d.* "empilement en pièces de monnaie"). La lumière réfléchie diminue alors rapidement durant cette étape.
- Dans une dernière étape, les rouleaux d'agrégats érythrocytaires se connectent entre eux pour former ce que l'on appelle des agrégats érythrocytaires en 3 dimensions, beaucoup plus robustes que les agrégats érythrocytaires en 2 dimensions. Durant cette phase, l'intensité de la lumière réfléchie diminue lentement.

L'intensité de la lumière réfléchie est mesurée uniquement après l'arrêt de la rotation du cylindre externe. La variation de la quantité de lumière réfléchie par le sang en fonction du temps est appelée syllectogramme. Plus l'intensité de la lumière réfléchie diminue rapidement plus l'agrégation érythrocytaire est rapide. L'appareil mesure la vitesse d'agrégation à l'aide de plusieurs indices : l'indice d'agrégation (AI), le temps nécessaire pour la formation de rouleaux (Tf), le temps nécessaire pour la formation de rouleaux en trois dimensions (Ts) ainsi que la quantité totale d'agrégats formés en 120 secondes (AMP). Dans nos différents articles nous n'avons tenu compte que du paramètre AI qui représente un taux d'agrégation sur une période de 10 secondes (Figure 80) et qui est très bien corrélé à un autre indice d'agrégation érythrocytaire obtenue avec un autre érythro-agrégomètre (l'indice M obtenue avec l'érythro-agrégomètre Myrenne) (30). Al est donné par la relation :

$$AI = (A/A+B) \times 100$$

210

où A représente l'aire au-dessus de la courbe (*c.-à-d.* syllectogramme) entre le moment où l'intensité de la lumière réfléchie atteint sa valeur maximale (isc_{top}) et 10 secondes après ce moment (isc_{top} + 10). B représente l'aire sous la courbe déterminée sur la même période que A et tenant compte de l'amplitude (Amp = isc_{top} - lsc_0) de la diminution de la lumière réfléchie après une période de 120 secondes (Figure 80). Al est ainsi exprimé en % et représente donc le pourcentage d'agrégats formés en 10 secondes par rapport à une valeur 100% qui représente la quantité d'agrégats formés en 120 secondes (*c.-à-d.* AMP). Hardeman et collaborateurs ont montré que AI était un facteur très sensible à la température mais AI semble être le paramètre le moins sensible aux conditions de stockage du sang et au niveau d'oxygénation de l'hémoglobine (*c.-à-d.* le laser émet une lumière à une longueur d'onde de 670 nm qui est facilement absorbée par l'hémoglobine désoxygénée) (163).



Figure 80. Représentation schématique d'un syllectogramme. Le syllectogramme est donné par la variation de l'intensité de la lumière réfléchie (I) par les érythrocytes au cours du temps ("Time") et comprend 4 étapes : 1) la désagrégation ("disaggregation stage"), 2) l'arrêt de la rotation du cylindre externe qui se traduit par une phase où les globules rouges reprennent leur forme de repos, 3) la formation de rouleaux érythrocytaires ("Rouleaux stage") immédiatement suivie par 4) la formation d'agrégats en 3 dimensions ("3D aggregation stage").

La principale limite de cette technique réside dans le fait que la vitesse d'agrégation est mesurée dans une condition relativement statique. Cependant, il est également à noter que la lumière laser émise à une longueur d'onde de 670 nm peut être absorbée par l'hémoglobine. Ce problème peut être fortement limité en oxygénant l'hémoglobine durant au moins 10-15 minutes avant chaque mesure (163).

IX.2.5.2 MESURE DE LA DESAGREGATION ERYTHROCYTAIRE

Pour la détermination du seuil de désagrégation érythrocytaire (c.-à-d. la vitesse de cisaillement minimale nécessaire pour séparer les agrégats érythrocytaires), le LORCA détermine, par itération, la courbe de la lumière réfléchie par les érythrocytes en fonction de la vitesse de cisaillement appliquée (Figure 81). Pour ce faire, 8 vitesses de cisaillements différentes sont appliquées avec une intensité croissante. Avant chacune de ces 8 vitesses de cisaillement, les érythrocytes sont partiellement désagrégés de telle manière que chaque mesure de la lumière réfléchie (I) à une vitesse de cisaillement donnée démarre à la même intensité initiale de réflexion de la lumière (Figure 81). Le LORCA détermine ainsi la différence (dl) entre la lumière réfléchie durant la phase de désagrégation (c.-à-d. toujours de même intensité) et l'intensité de la lumière réfléchie durant les 8 vitesses de cisaillements appliquées. L'intensité de la lumière réfléchie augmente à mesure que les érythrocytes se désagrègent. Ainsi, le seuil de désagrégation est obtenu lorsque dl atteint sa valeur minimale (Figure 81). Pour affiner le seuil de désagrégation érythrocytaire, le LORCA applique 2 autres vitesses de cisaillement supplémentaires autour de la valeur de vitesse de cisaillement (parmi les 8 vitesses de cisaillement testées) pour laquelle il a obtenu un dI minimum.



Figure 81. Technique de détermination du seuil de désagrégation par le LORCA. Le seuil de désagrégation érythrocytaire est mesuré à l'aide d'une courbe prenant en compte la différence ("dl") entre la lumière réfléchie durant la phase de désagrégation érythrocytaire ("disaggregation shear rate") et la lumière réfléchie durant la vitesse de cisaillement ("shear rate") donnée (figure de gauche). Le niveau de désagrégation initial est paramétré par l'appareil de telle sorte que le niveau initial de réflexion de la lumière avant l'application d'une vitesse de cisaillement soit toujours le même (figure de gauche). Le seuil de désagrégation est défini comme la vitesse de cisaillement où la différence "dl" est minimale (figure de droite).

IX.3 TECHNIQUES DE MESURE DE L'OXYGENATION SANGUINE ET TISSULAIRE

IX.3.1 INTRODUCTION

La lumière est composée d'ondes électromagnétiques transportant de l'énergie pouvant traverser de très nombreux milieux de nature variée. Les ondes électromagnétiques et leurs rayonnements connaissent de très nombreuses applications dans la vie de tous les jours ainsi que dans le milieu médical (Figure 82).



Figure 82. Le spectre électromagnétique et ses applications technologiques dans la vie courante. La spectroscopie dans le proche infrarouge ("near-infrared spectroscopy") et l'oxymétrie de pouls ("pulse oximetry") utilisent les propriétés de la lumière dans le proche infrarouge. D'après (384).

La partie du spectre électromagnétique comprise entre 400 et 700 nm est appelée lumière visible. En deçà et au-delà du spectre de la lumière visible se situent respectivement la lumière ultraviolette et la lumière du proche infrarouge (700-1500 nm). La propagation de la lumière à travers les tissus biologiques dépend de la réflexion, de la dispersion et de

l'absorption de cette lumière (196). La réflexion est majoritairement déterminée par l'angle d'incidence de la lumière en relation avec le tissu. La dispersion est due à la réfraction de la lumière dans un tissu alors que l'absorption est un processus dans lequel un chromophore capte l'énergie des photons. La dispersion et l'absorption de la lumière dans le tissu sont dépendantes de la longueur d'onde de la lumière utilisée. Ainsi chaque longueur d'onde a ses propriétés spécifiques.

L'oxymétrie de pouls et la spectroscopie du proche infrarouge (SPIR) sont deux techniques utilisant les propriétés de la lumière dans le proche infrarouge pour mesurer le niveau d'oxygénation du sang.

IX.3.2 PROPRIETES ET INTERETS DE LA LUMIERE DU PROCHE INFRAROUGE

La dispersion des photons diminue simplement avec l'augmentation de la longueur d'onde alors que le pattern d'absorption possède un comportement plus complexe. Au-delà de 1300nm, la lumière est complètement absorbée par l'eau dans les couches les plus superficielles de la peau. Dans le spectre de la lumière visible sous 700nm, la lumière est complètement absorbée par l'hémoglobine et la myoglobine contenues dans le sang et les cellules musculaires. Dans la région du proche infrarouge entre 700 et 1300nm, l'absorption de la lumière par l'eau, l'hémoglobine et la myoglobine est moindre et ainsi la lumière peut traverser les tissus. Cette caractéristique de la relative transparence du tissu à la lumière comprise dans la région du proche infrarouge est exploitée en spectroscopie du proche infrarouge (SPIR) (196). En choisissant des longueurs d'onde spécifiques de la lumière du proche infrarouge, on est à même de distinguer des chromophores absorbant une lumière proche infrarouge spécifique. Ainsi il devient possible de suivre les changements de concentration de différents chromophores tels que l'oxyhémoglobine (HbO₂) et la désoxyhémoglobine (HHb).
IX.3.3 LA SPECTROSCOPIE DANS LE PROCHE INFRAROUGE (SPIR) - ETUDES N°3 ET 4

Le SPIR est une technique non invasive, qualitative (*c.-à-d.* permet la détection d'un chromophore au sein d'un produit) et quantitative car elle permet de déterminer le dosage des chromophores étudiés à savoir l'oxyhémoglobine (HbO₂), la désoxyhémoglobine (HHb) et la cytochrome oxydase.

MESURE DE L'OXYGENATION DE LA MICROCIRCULATION SANGUINE A L'AIDE DU NIRO-200 Il existe différents types de spectroscopes dans le proche infrarouge. Dans les études 3 et 4 nous avons utilisé le NIRO-200 pour mesurer différents paramètres. Pour la mesure de ces paramètres, le NIRO-200 utilise deux techniques de mesures différentes :

- l'une est basée sur la loi de Beer-Lambert modifiée et permet de déterminer les concentrations d'hémoglobine oxygénée (HbO₂), d'hémoglobine désoxygénée (HHb) et l'hémoglobine totale (cHb = HbO₂ + HHb). En utilisant la méthode des occlusions veineuses, il est possible d'obtenir le débit sanguin local dans la microcirculation musculaire et la consommation locale d'oxygène par les tissus musculaires (386) (Etude 4).
- l'autre technique utilise la méthode de spectroscopie à résolution spatiale pour mesurer la saturation de l'hémoglobine en oxygène dans la microcirculation sanguine (TOI ou tissu oxygen index) (133, 300) (Etudes 3 et 4).

PRESENTATION DU MATERIEL

Le NIRO-200 est un spectromètre dans le proche infrarouge qui comprend une interface, un laser capable d'émettre à 3 longueurs d'ondes différentes (*c.-à-d.* 775, 810 et 850 nm) et une sonde comprenant une optode d'émission et une optode de réception (Figure 83).



Figure 83. Présentation du NIRO-200.

Les longueurs d'ondes générées par le laser sont transportées aux tissus par le biais d'un faisceau de fibres optiques appelées optodes d'émissions. Une seconde optode enregistre l'atténuation de la lumière et est placée parallèlement à l'optode d'émission. La lumière proche infrarouge pénètre la peau, la graisse sous cutanée/la boite crânienne, et le tissu d'intérêt (muscle ou cerveau) et est dispersée, absorbée ou réfléchie à l'intérieur de ce tissu. Ainsi une partie de la lumière passe de l'optode d'émission à l'optode de réception par un trajet en forme de banane appelé "pathlengh" (106) (Figure 84). L'atténuation de la lumière entre les deux optodes permet de déterminer la concentration du chromophore étudié à savoir l'oxyhémoglobine (HbO₂), la désoxyhémoglobine (HHb), l'hémoglobine fonctionnelle totale (cHb). La concentration du chromophore est obtenue grâce à la loi de Beer-Lambert modifiée.



Figure 84. Une partie de la lumière proche infrarouge émise par l'optode d'émission ("sourcer") traverse la peau, la graisse sous-cutanée/boite cranienne ("skull") et les tissus avec un trajet en forme de banane appelé "pathlengh". L'atténuation de la lumière est ensuite enregistrée par l'optode de réception ("detector"). D'après (133).

CALCUL DES CONCENTRATIONS D'OXYHEMOGLOBINE (HBO₂) ET DESOXYHEMOGLOBINE

(HHB) ET D'HEMOGLOBINE FONCTIONNELLE TOTALE (CHB)

Le calcul des concentrations d'HbO₂, d'HHb et de cHb (*c.-à-d*. cHb = HbO₂ + HHb) est permis grâce à la loi de Beer-Lambert modifiée :

$$DO_{tot\lambda} = A_{\lambda} + S_{\lambda} = \sum_{i=1}^{Nc} (\epsilon_{\lambda i} I_{\lambda i} C_{i}) + S_{\lambda}$$

Avec $L_{\lambda i}$ = d. DPF_{λ}

Où :

- DO_{tot} est la densité optique ou atténuation de la lumière,

- A_{λ} : l'atténuation de la lumière liée à l'absorption,
- S_{λ} : la perte de signal due à la dispersion (parfois nommée G).
- i : le chromophore considéré,
- Nc : le nombre total de chromophores considérés,
- $\boldsymbol{\epsilon}_{\lambda i}$: le coefficient d'extinction spécifique du chromophore i étudié,
- Ci : la concentration de la molécule ou du chromophore étudié (en µmol/cm)
- L_{λi}: le trajet optique à la longueur d'onde λ pour la molécule ou le chromophore i étudié (en cm),
- **d** : la distance inter-optodes en cm,
- DPF_λ: Differential Pathlength Factor, correction de la distance parcourue par la lumière d'une longueur d'onde λ. Ce facteur est dû au fait que la lumière voyage non pas de manière rectiligne dans les tissus mais en forme de banane (Figure 84).

En mesurant les variations d'atténuation de la lumière, et en considérant que la constante de dispersion de la lumière (S_{λ}) et l'absorption de la lumière proche infrarouge par les tissus sont constantes sur des temps courts (*c.-à-d.* quelques minutes à quelques heures), il est possible de calculer les variations de concentration d'un chromophore au cours du temps (Figure 85). Pour un milieu ne contenant qu'un chromophore on obtient :

 $\Delta C_i = \Delta A_\lambda / \epsilon_\lambda i. I_{\lambda i}$



Figure 85. Les variations d'atténuation des différentes longueurs d'onde émises par le laser du spectroscope dépendent uniquement des variations d'oxygénation de l'hémoglobine. Schéma adapté à partir de (339).

Or, la lumière est absorbée de manière spécifique par l'hémoglobine (HbO₂) oxygénée et l'hémoglobine désoxygénée (HHb) qui possèdent des coefficients d'extinction différents en particulier à des longueurs d'ondes données : ~775 nm, ~850 nm (Figure 86). Le NIRO-200 utilise ainsi 3 longueurs d'ondes (*c.-à-d.* une longueur d'onde supplémentaire pour distinguer l'absorption de la lumière par l'eau) pour distinguer les variations de concentration de l'HbO₂ et l'HHb (*c.-à-d.* à partir d'un système de 3 équations à 3 inconnues).

Le NIRO-200 peut être utilisé dans le cadre de la drépanocytose pour mesurer ces variations d'HbO₂ et d'HHb depuis qu'il a été montré que les coefficients d'extinction de l'HbO₂ et de l'HHb avaient la même signature pour l'hémoglobine A que pour l'hémoglobine S (268). Les variations de concentrations d'hémoglobine fonctionnelle totale (Δ cHb) sont ensuite obtenues par addition de Δ HbO₂ et d' Δ HHb.



Figure 86. Coefficient d'extinction de l'hémoglobine oxygénée et désoxygénée en fonction de la longueur d'onde. Cette figure montre que l'oxyhémoglobine ("O₂Hb") et la désoxyhémoglobine ("HHb) ont des coefficients d'extinction ("Extinction Coefficient") différents. D'après (415).

Calcul de la saturation en \mbox{HbO}_2 dans la microcirculation

La saturation en HbO₂ dans la microcirculation du tissu d'intérêt (TOI ou "tissu oxygen index") est calculée par le NIRO-200 à partir de la relation suivante :

$$TOI = [HbO_2 / (HHb + HbO_2)] \times 100$$

Cependant le mode de calcul diffère quelque peu de celui utilisé pour mesurer les variations de concentrations d'HHb et HbO₂ par la loi de Beer-Lambert modifiée. Pour la mesure du TOI, le NIRO-200 utilise la technique de spectroscopie à résolution spatiale (SRS ou "spatial resolved spectroscopy"). Il s'agit d'une mesure des concentrations d'HbO₂ et d'HHb à 3

distances différentes ce qui permet d'éliminer au maximum la part de lumière absorbée par les tissus (p. ex. peau, graisse, liquide cérébrospinale, boite crânienne) (421). La mesure des concentrations d'HbO₂ et d'HHb à partir de la méthode utilisant la loi de Beer-Lambert modifiée n'utilise qu'une seule lamelle de l'optode de réception (*c.-à-d.* donc qu'une seule distance interoptode) alors que la méthode SRS utilise les 3 lamelles de l'optode de réception (Figure 87).



Figure 87. Le NIRO-200 comprend une optode de réception contenant 3 lamelles enregistrant l'atténuation de la lumière du proche infrarouge à trois distances différentes. Cette méthode de spectroscopie à résolution spatiale est utilisée par le NIRO-200 pour calculer la saturation de l'hémoglobine en oxygène dans la microcirculation tissulaire (TOI ou "tissu oxygen index"). Ainsi, le TOI est relativement peu influencé par l'épaisseur des tissus/boite crânienne (421) contrairement à la méthode de calcul utilisant la loi de Beer-Lambert modifiée (385) qui n'utilise qu'une seule lamelle de l'optode de réception. D'après (339) et modifiée à partir de (366).

Dans les études 3 et 4 le TOI a été moyenné sur une période stable de 5 minutes minimum chez l'ensemble des sujets ayant participé à l'expérimentation. L'enregistrement a démarré une fois que le sujet était au repos depuis au moins 10 minutes.

MESURE DU DEBIT SANGUIN MICROCIRCULATOIRE ET DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE MUSCULAIRE PAR LA METHODE DES OCCLUSIONS VEINEUSES

Dans l'étude n°4, le débit sanguin de la microcirculation du muscle fléchisseur superficiel des doigts ainsi que sa VO₂ locale ont été mesurés au repos en utilisant la méthode des occlusions veineuses. La VO₂ locale a été mesurée au niveau du fléchisseur superficiel de l'avant bras pour deux raisons : 1) il s'agit un muscle recruté durant une tâche de "handgrip", 2) ce muscle se situant sur l'avant bras permet de réaliser facilement une occlusion veineuse en amont, au niveau du bras.

La méthode des occlusions veineuses consiste à fixer un brassard au niveau du bras du sujet et à le gonfler à une pression de 50 mmHg. Ainsi le sang ne peut plus quitter le bras et s'accumule et l'on observe une augmentation des concentrations d'HHb, d'HbO₂ et de cHb (Figure 88). Le calcul de la pente de cHb permet d'obtenir le débit sanguin local. D'autre part, le sang ne pouvant plus s'évacuer du bras, l'accumulation d'HHb est à attribuer à la consommation d'oxygène locale par le muscle (107). La mesure du débit sanguin par occlusion veineuse étant très dépendante de la concentration d'hémoglobine propre aux sujets, nous avons normalisé les valeurs en les divisant par la concentration d'hémoglobine propre au sujet.



Figure 88. Représentation de l'accumulation de HHb (en bleu), HbO₂ (en rouge) et cHb (en blanc) lors d'une occlusion veineuse.

Plusieurs précautions sont à prendre (386):

- Le sujet doit être au repos au moment de la mesure (10 minutes au moins dans les études n°3 et 4).
- Le bras doit être placé au niveau du cœur (*c.-à-d.* pour limiter les effets de la gravité)
- les optodes du SPIR doivent être placés toujours au même endroit pour chacun des sujets. Pour l'expérimentation n°4, le centre de la sonde (entre les deux optodes) a été placé au tiers de l'avant bras, sur le fléchisseur superficiel de l'avant bras, en mesurant la distance à partir du coude.
- 3 occlusions au moins sont réalisées afin de moyenner les valeurs
- le temps entre deux occlusions est déterminé par la durée nécessaire pour que cHb atteigne sa valeur initiale (*c.-à-d.* celle observée avant la première occlusion). Ce temps est généralement d'une minute.

- HHb et cHb sont déterminés à l'aide de la loi de Beer-Lambert modifiée et la quantité de lumière absorbée est fortement influencée par l'épaisseur de la peau et de la couche sous cutanée de graisse (385). Ainsi pour permettre une comparaison des valeurs entre individus, nous avons pris soin d'avoir des moyennes et écart-type de l'épaisseur du pli cutané comparables dans chaque groupe de l'étude n°4.
- Les vitesses d'accumulation d'HHb et cHb sont moyennées sur une période de 10 secondes au moins et au centre de la pente (*c.-à-d.* pour éviter l'influence de la période où le brassard est gonflé mais également l'influence de la phase de plateau de la courbe dû au fait que la pression sanguine veineuse se rapproche (ou dépasse) les 50 mmHg). La durée des occlusions veineuses retenue était de 30 secondes (386) et la vitesse d'accumulation étudiée se situait généralement entre 10 et 20 secondes.

Il est à noter que la VO₂ musculaire peut être déterminée de manière plus fiable par occlusion artérielle (386). Cependant cette méthode n'a pas été retenue du fait du risque de crise vaso-occlusive qu'encourent les patients drépanocytaires lorsque l'hémoglobine S relargue son oxygène, lors d'une ischémie prolongée.

PLACEMENTS DES OPTODES DANS LES ETUDES N°3 ET N°4

Les deux optodes sont placés dans un cache qui protège de la lumière et qui est collé directement sur la peau au dessus du tissu d'intérêt à l'aide d'un adhésif médical double face. La distance interoptode utilisée dans les études n°3 et 4 était de 4 cm. Pour l'étude n°3, la sonde, contenant les deux optodes, a été placée au niveau du cortex préfrontal entre l'aire 10 et 46 de Brodmann pour éviter les sinus sagittal et frontal et dans l'étude n°4 la sonde a été placée au premier tiers proximal de l'avant-bras sur le muscle fléchisseur superficiel des doigts. La pièce a été baignée dans l'obscurité pour éviter toute influence de la lumière des néons. Enfin, les signaux étant très sensibles aux changements de position, la position

assise des sujets a été normalisée avec un angle tronc-cuisse de 110° et les accoudoirs réglés de telle manière à ce que les bras soient au niveau du coeur. Il a également été demandé aux sujets de ne pas bouger durant la période de 10 minutes où la mesure a été réalisée.

MESURE DU VASOMOTION ET DU FLOWMOTION

Le vasomotion et le flowmotion ont été analysés à partir du signal TOI (412). Au repos, la consommation d'oxygène cérébrale (étude n°3) ou musculaire (étude n°4) est considérée comme constante ainsi les variabilités du TOI rendent compte, d'après le principe de Fick, de la variabilité de cHb (*c.-à-d.* et donc du flux sanguin) (412). L'intérêt de l'utilisation du TOI et non de cHb est que le TOI utilise la technique de spectroscopie à résolution spatiale : l'impact de l'épaisseur des tissus sur l'absorption de la lumière du proche infrarouge est moins important que pour le paramètre cHb. Nous avons vu dans la partie *mesure du vasomotion et du flowmotion* que la variabilité du flux sanguin peut être décomposée en 5 bandes fréquentielles. Les 3 plus basses rendent compte du vasomotion et les deux plus hautes de la fréquence respiratoire et de la fréquence cardiaque, respectivement.

La décomposition du signal TOI en 5 bandes fréquentielles a été réalisée à l'aide d'une transformation rapide de Fourrier (Fast Fourrier Transform, méthode du périodogramme de Welch) sur Kubios Software après un ré-échantillonnage des données à 2Hz. Pour l'analyse du signal, une période stable la plus longue possible a été retenue (5 minutes minimum). Les résultats sont donnés sous forme de puissance de la variabilité pour une bande de fréquence donnée ou de puissance totale de la variabilité du signal (*c.-à-d.* intensité du flowmotion).

Il est à noter cependant que si au niveau musculaire la signification des 3 bandes du vasomotion est bien définie, cela n'est pas le cas au niveau cérébral. Nous avons cependant bien observé des pics de fréquences dans chacune des trois bandes fréquentielles retenues.

227

AVANTAGES ET LIMITES DU NIRO-200

Contrairement à d'autres techniques comme la fMRI (fonctional magnetic resonance imaging), le SPIR permet de mesurer les concentrations d'HbO₂ et d'HHb. Il s'agit d'une méthode non-invasive qui ne nécessite pas d'ionisation pour suivre les changements de l'hémodynamique cérébrale. Elle permet également des mesures continues en temps réel sur des durées prolongées avec une bonne résolution temporelle. Enfin cette technique est peu couteuse par rapport aux instruments d'imagerie traditionnelle.

Cependant le NIRO-200 a une résolution spatiale limitée à la zone entre les deux optodes, à une profondeur d'environ 60% de la distance interoptode (133). La distance interoptode doit cependant rester de préférence entre 4 et 5 cm. En deçà, l'oxygénation du tissu d'intérêt est peu prise en compte et au-delà, il y a une augmentation du bruit du signal.

Les variables mesurées à l'aide de la loi de Beer-Lambert modifiée (contrairement au TOI mesuré avec la méthode SRS) sont très sensibles à l'épaisseur de la peau, du tissu adipeux ou de la boite crânienne. Au-delà de 15 mm d'épaisseur, le SPIR ne mesure plus l'oxygénation des tissus (385). En outre, au niveau musculaire, il est impossible de distinguer le spectre d'absorption de l'hémoglobine de celui de la myoglobine bien que sa participation dans le signal soit faible (133). D'autre part, le NIRO-200 ne permet pas de distinguer l'oxygénation du versant artériel avec celui du versant veineux qui représente ~65% du signal enregistré (388). Le NIRO-200 ne tient pas compte de la présence d'hémoglobine dysfonctionnelle dans son calcul du TOI. En effet, les hémoglobines dysfonctionnelles possèdent d'autres coefficients d'extinction de la lumière qui ne sont pas mesurés par le NIRO-200 (Figure 89). Enfin, la plus grosse limite du NIRO-200 est que la longueur du chemin parcourue par la lumière ("pathlengh") dans le proche infrarouge est inconnue et nécessite d'utiliser un DPF (*c.-à-d.* differential Pathlength factor) moyen. Or, le DPF varie

228

avec l'âge (117) et entre individus du même âge (118). Cette variabilité inter-individus est de l'ordre de 10-15% et se répercute directement sur les valeurs enregistrées (118, 300).

IX.3.4 MESURE DE LA SATURATION ARTERIELLE EN OXYGENE (ETUDES N°1,2,3 ET 4)

La mesure de la saturation en oxygène – le pourcentage d'hémoglobine saturé en oxygène est un indicateur important de l'état de santé cardio-respiratoire du patient et permet de mieux rendre compte de l'hypoxémie qu'une mesure de la PaO₂ (109). En effet nous avons vu (chapitre. IV) que pour une PaO₂ normale, la saturation en O₂ pouvait être diminuée. La mesure de la saturation artérielle du sang en oxygène peut être obtenue à l'aide de trois méthodes différentes :

- Analyse des gaz du sang (SaO₂)
- Oxymétrie de pouls (SpO₂)
- Co-oxymétrie (FO₂Hb ou SO₂)

Ces trois techniques sont souvent utilisées de manière interchangeable. En effet, chez la plupart des patients les résultats de la SaO₂, de la SpO₂ et de la FO₂Hb sont comparables. Cependant dans le cadre des dyshémoglobinémie (*c.-à-d.* présence d'hémoglobine dysfonctionnelle) certaines méthodes peuvent conduire à des résultats erronés (168). C'est le cas dans la drépanocytose où il existe deux formes d'hémoglobines dysfonctionnelles qui ne peuvent transporter de l'oxygène à savoir la methémoglobine (MetHb), dû au stress oxydant qui entraîne une oxydation du fer ferreux de l'hémoglobine en fer ferrique) et la carboxyhémoglobine (COHb).

PRESENTATION SUCCINCTE DES TROIS PRINCIPALES TECHNIQUES DE MESURE DE

L'OXYGENATION ARTERIELLE DU SANG

La co-oxymétrie est la technique de référence pour la mesure de la saturation artérielle en oxygène (SaO₂) mais également la saturation artérielle fractionnelle de l'hémoglobine en oxygène (FO₂Hb) :

SaO₂ ou SpO₂ = [HbO₂ / (HHb+HbO₂)] x 100
et
$$FO_2Hb = (HbO_2 / tHb) x 100$$

avec

tHb (hémoglobine totale) = HbO₂ + HHb + MetHb + COHb + FSHb (Sulfhémoglobine)

Il s'agit d'une technique qui, à partir d'un prélèvement sanguin artériel, mesure l'absorption de la lumière de 6 à 128 longueurs d'ondes différentes selon le modèle (168). Ainsi cette technique est capable de mesurer la présence d'HHb et d'HbO₂ mais également la présence d'hémoglobine dysfonctionnelle comme la MetHb, la COHb ou encore la sulfhémoglobine (FSHb).



Figure 89. Ce graphique montre la relation entre l'absorption de la lumière et les différentes formes d'hémoglobines présentes chez les patients drépanocytaires : hémoglobine oxygénée (HbO₂), désoxygénée (HHb), carbhémoglobine (COHb) et methémoglobine (MetHb). Les deux lignes verticales noires indiquent la lumière infrarouge (R) et proche infrarouge (IR) utilisée par l'oxymètre de pouls à 660 et 940 nm respectivement. D'après (168).

L'oxymétrie de pouls est la technique que nous avons utilisée dans les quatre études. Elle a l'avantage d'être non invasive et de permettre des mesures en continu mais ne permet pas la mesure de l'hémoglobine dysfonctionnelle (voir ci-dessous pour le détail).

L'analyseur des gaz du sang enfin est également une technique qui à partir du pH et de la PO₂ du sang artériel prélevé de manière invasive, permet le calcul indirect de la saturation en oxygène de l'hémoglobine. Cette technique a comme désavantage de ne pas tenir compte de la présence d'hémoglobine dysfonctionnelle ainsi que de la variabilité de la

courbe de dissociation de l'hémoglobine chez les patients drépanocytaires. Cette technique est donc la moins fiable des trois techniques de mesure de la saturation artérielle en oxygène (168).

L'oxymétrie de pouls et l'analyse des gaz du sang mesurent la saturation de l'hémoglobine en oxygène et non le pourcentage d'hémoglobine fonctionnelle saturée en oxygène (Figure 90). Les valeurs obtenues diffèrent donc dans le cadre de la drépanocytose selon la technique utilisée (Figure 90).



Figure 90. Causes de la désaturation de l'hémoglobine chez les enfants atteints de la drépanocytose et valeurs obtenues chez ces patients selon la technique de mesure de l'oxygénation artérielle utilisée. HbO_2 = hémoglobine oxygénée, COHb = carboxyhémoglobine, MetHb = methémoglobine. SpO_2 = valeur obtenue par oxymétrie de pouls, SaO_2 = valeur de saturation obtenue par l'analyse des gaz du sang et FO₂H = valeur obtenue par co-oxymétrie (méthode de référence). D'après (273).

OXYMETRIE DE POULS

Il s'agit de la technique utilisée dans les 4 études. L'oxymètre de pouls (ou saturomètre) permet de mesurer de façon simple, continue et non invasive la saturation artérielle de l'hémoglobine en oxygène (SpO₂).

$$SpO_2 = (HbO_2/(HHb + HbO_2)) \times 100$$

La SpO₂ représente la saturation pulsée de l'hémoglobine en oxygène afin de la distinguer de la saturation artérielle de l'hémoglobine en O₂ mesurée par les gaz du sang (SaO₂). La SpO₂ est donnée en pourcentage.

L'appareil se compose d'un moniteur qui permet d'observer les constantes et d'un capteur qui prend généralement la forme d'un doigtier (Figure 91). Comme pour un spectromètre dans le proche infrarouge, l'oxymètre utilise les propriétés de la lumière pour mesurer la saturation en O₂. L'oxymètre de pouls utilise deux lumières : rouge (600 à 750 nm) et dans le proche infrarouge (850 à 1000 nm) (Figure 89). Ces lumières sont envoyées par l'émetteur situé dans le doigtier. L'absorption de la lumière rouge et proche infrarouge est ensuite enregistrée par le récepteur afin de déterminer les concentrations d'HHb ou d'HbO₂ (voir figure 91). L'oxymètre de pouls calcule la saturation du flux pulsatile, en éliminant les valeurs correspondantes au sang veineux et capillaire.



Figure 91. Présentation schématique du doigtier de l'oxymétrie de pouls contenant des diodes émettrices et un photo-détecteur.

LIMITES DE LA MESURE

Cette technique de mesure de la saturation artérielle en O_2 ne fonctionne que lorsque le flux est pulsatile. Cela signifie que la SpO₂ n'est pas fiable dans les situations où le sang circule mal à l'endroit où est placé le doigtier. L'hypotension artérielle, un bas débit, une vasoconstriction périphérique donnent lieu à des valeurs moins fiables. De même, si l'on place un brassard à pression artérielle sur le même bras que le capteur, l'oxymètre de pouls ne fonctionne pas pendant la mesure. La précision de l'appareil est de \pm 2% pour un intervalle de saturation compris entre 70 et 100% (420).

Enfin, le vernis à ongles et les néons puissants peuvent également fausser la mesure. L'hyperbilirubinémie fréquente chez les patients drépanocytaires est en revanche sans effet sur la mesure de la SpO₂ (395).

IX.4 LE TEST DE MARCHE DE 6 MINUTES - ETUDE N°2

Le test de marche a été utilisé pour l'étude n°1 afin de tester les facteurs indépendamment associés avec une hypoxémie induite par l'exercice. Il s'agit d'un test sous-maximal souvent utilisé dans la population pédiatrique drépanocytaire car corrélé au risque d'hypertension artérielle pulmonaire (72, 257). Le test de marche de 6 minutes a été retenu pour sa simplicité d'utilisation (*c-à-d*. comparé à un test d'effort calibré) et pour son faible risque clinique. Par ailleurs, la performance au test de marche de 6 minutes est corrélée à la performance maximale (ou symptôme limité) aérobie chez les drépanocytaires (résultats personnels de Roberto Machado).

Le test de marche de 6 minutes (TM6M) est un test simple, individualisé, qui mesure la distance parcourue en marche rapide par un patient sur un terrain plat et dur, pendant 6 minutes. Le TM6M n'est pas conçu pour évaluer les limitations à l'exercice chez les patients. Il permet de mesurer les capacités physiques fonctionnelles nécessaires dans la vie quotidienne (2). Afin d'obtenir des résultats cohérents, il est important que les tests soient réalisés à chaque fois de la même manière et ils doivent respecter de nombreux critères (2).

PREPARATION DU PARCOURS

Ce test doit être réalisé en navette. La distance entre les deux "plots" est généralement de 30 m. Cependant, il a été montré que la distance peut varier entre 15,24 et 50,29 m sans avoir d'influence sur le résultat (345). La distance "inter-plot" retenue dans l'étude n°2 était de 21 m.

Un mur aux abords du parcours est nécessaire afin que les patients puissent s'y appuyer, si besoin, pendant le test. La longueur du parcours est marquée tous les 3 mètres. Pour la sécurité le test a été réalisé au service de pédiatrie du CHU de Pointe-à-Pitre pour permettre l'accès rapide à un service et/ou équipement médical d'urgence.

236

AVANT DE COMMENCER LE TEST

Il s'agit de vérifier que le patient porte des vêtements et des chaussures appropriés pour marcher. Il s'agit de faire asseoir le patient sur une chaise près du point de départ au moins dix minutes avant le début du test. Les patients ne doivent pas avoir fait d'efforts importants dans les deux heures précédant le test.

EXPLICATION DU DEROULEMENT DU TEST AU PATIENT

Il s'agit d'expliquer au patient qu'il va devoir effectuer un test d'effort physique. Afin de limiter les risques, une visite clinique a d'abord été réalisée par un des médecins investigateurs de l'étude. Puis nous avons demandé aux patients de nous avertir s'ils souffrent d'une douleur quelconque. Aucun de ces signes n'a été observé chez nos 107 enfants drépanocytaires. Leur niveau de dyspnée au repos a été évalué à l'aide d'une échelle de BORG (2).

INSTRUCTION AU PATIENT :

« Le but de ce test est de parcourir en marchant la plus grande distance possible en 6 minutes, en effectuant des allers et retours sur le parcours délimité par les cubes. Marcher 6 minutes, c'est long, il va donc falloir faire un effort important. Vous allez probablement vous sentir essoufflé et épuisé. Vous pouvez donc ralentir, vous arrêter ou vous reposer si nécessaire. Vous pouvez vous appuyer contre le mur pendant le repos, mais vous devez reprendre la marche dès que possible. Vous effectuerez des allers-retours en faisant demitour autour de ces cubes verts. Il vous suffit de pivoter rapidement autour des cubes et de continuer dans l'autre sens sans marquer de temps d'arrêt ni d'hésitation. Je vais vous montrer comment faire. Regardez bien la manière dont je fais demi-tour sans hésiter. »

Etes-vous prêt à le faire ? Rappelez-vous que le but du test est de parcourir en marchant LA PLUS GRANDE DISTANCE POSSIBLE en 6 minutes, mais ne courez pas. De mon côté, je 237

vais compter le nombre de longueurs parcourues. Vous pouvez commencer maintenant ou dès que vous vous sentirez prêt ».

Les encouragements sont réguliers et réalisés sur un ton de voix normal. Nous avons évité tout autre mot (ou geste) d'encouragement qui pouvait faire accélérer le patient momentanément et le fatiguer rapidement. Nous avons veillé à une certaine constance tout au long du test. Les encouragements ont été standardisés de la manière suivante :

- Après la première minute « vous vous en sortez très bien. Il vous reste 5 minutes ».
- 2 minutes : « continuez comme ça. Il vous reste 4 minutes ».
- 3 minutes : « c'est bien. Vous en êtes à la moitié »
- 4 minutes : « continuez comme cela. Plus que 2 minutes »
- 5 minutes : « c'est bien. Il ne vous reste plus qu'une minute ».

CALCUL DU POURCENTAGE DE LA DISTANCE PREDITE

Pour chaque patient, le pourcentage de la distance prédite a été calculé à partir du modèle de Geiger et collaborateurs obtenu chez des enfants sans pathologies (144). Pour les garçons, la distance prédite est calculée à partir de l'équation suivante :

Distance prédite sur 6 minutes = $196.72 + (39,81x \, \hat{a}ge) - (1,36 \, x \, \hat{a}ge^2) + (132,28 \, x \, taille)$.

Pour les filles :

Distance prédite sur 6 minutes = $188,61 + (51,50 \times age) - (1,86 \times age^2) + (86,10 \times taille)$.

IX.5 MESURE DE LA FORCE ET DE LA FATIGABILITE DU MUSCLE FLECHISSEUR SUPERFICIEL DES DOIGTS - ETUDE N°4

Afin de tester la force maximale ainsi que la fatigabilité à l'effort chez les patients drépanocytaires adultes de l'étude n°4, un test de "Handgrip" a été réalisé à l'aide d'une poignée de force reliée à un ordinateur à l'aide d'un système d'acquisition (MP30, système BIOPAC, Santa Barbara, CA, Etats-Unis). Dans un premier temps, les sujets ont été familiarisés avec le matériel et la procédure au moment de la visite clinique d'inclusion à l'étude. Puis, le jour de l'expérimentation, il a été demandé aux sujets de réaliser trois contractions maximales volontaires (CMV) de 5 secondes espacées d'une minute de repos. Avant chaque tentative le sujet est préparé et encouragé. La contraction pour laquelle la force la plus élevée a été observée a été retenue comme CMV pré-exercice. Puis, après une période de 5 minutes de repos, les sujets ont réalisé un exercice d'une minute. Cet exercice consistait à serrer la poignée de force durant 5 secondes à 50% de la CMV pré-exercice avec entre chacune des 6 contractions, 5 secondes de repos. L'intensité des 50% de la CMV pré-exercice était visualisée par une ligne noire sur l'ordinateur et la force de leur contraction par une ligne rouge. La tâche consistait durant la contraction à faire coïncider la ligne rouge avec la ligne des 50% de la CMV pré-exercice. Ce test de handgrip a été emprunté à Hamaoka et collaborateurs (158). La durée de ce test est normalement de 3 minutes. Cependant, pour des questions de sécurité liées à la pathologie drépanocytaire, la durée a été limitée à une minute dans l'étude n°4. Une ischémie prolongée est susceptible de déclencher une crise vaso-occlusive dans cette pathologie. Ce test permet en principe de mesurer la VO₂ musculaire à l'exercice. En effet, si la contraction musculaire est suffisamment importante, il s'ensuit une occlusion artérielle. Le sang ne rentre plus et ne sort plus de l'avant-bras. Ainsi, toute diminution de HbO₂ rend compte d'une consommation d'oxygène par le muscle actif durant la contraction. Il s'est avéré que si ce test pouvait être employé chez des sujets sains, les données de VO₂ musculaire à l'exercice se sont avérées non exploitables chez nos patients drépanocytaires.

Après la 6^{ème} contraction à 50% de la CMV, le sujet avait 10 secondes de repos avant de devoir réaliser une nouvelle CMV appelé CMV post-exercice. Le sujet a été préparé et encouragé comme lors des premières CMV. Le pourcentage de la diminution de la force entre la CMV pré-exercice et la CMV post-exercice a été retenu comme un indice de fatigabilité musculaire.

Afin de contrôler la qualité de la CMV retenue, plusieurs critères ont été pris en compte :

- Les CMV pré- et post-exercice devaient avoir un pic de force au début de la contraction suivi d'une décroissance de la force durant le restant des 5 secondes de contraction.
- Les valeurs de CMV pré-exercice devaient être plus importantes que la valeur de CMV post-exercice.
- La qualité des CMV a également été contrôlée à l'aide d'un enregistrement électromyographique (EMG) de surface. Le signal EMG du muscle en activité a été enregistré à l'aide de 2 électrodes Ag/AgCl d'un diamètre de 9 mm (Red Dot[™], Saint Paul, Canada). Les électrodes ont été placées sur le fléchisseur superficiel des doigts de manière distale par rapport aux optodes du spectroscope dans le proche infrarouge après avoir préparé la peau (dégraissage et nettoyage à l'alcool à 90°). La distance interélectrodes était de 20 mm. Le système EMG a été enregistré en direct sur l'ordinateur et synchronisé avec le signal de la poignée de force à l'aide d'un système d'acquisition sur lequel a été branchée la poignée de force (MP30, Biopac Systems, Santa Barbara, CA, Etats-Unis). Le signal EMG a été amplifié 1000x et enregistré à une fréquence de 1000Hz. Les signaux ont été filtrés pour la bande de fréquence 30-500 Hz. L'amplitude du signal EMG a ensuite été quantifiée en

calculant le Root Mean Square (RMS) sur une période de 1 seconde au niveau du pic d'intensité des CMV pré- et post-exercice. Les CMV ont été validées lorsque la valeur du RMS lors de la CMV post-exercice était égale ou légèrement supérieure à la CMV pré-exercice. L'indice RMS correspond au nombre d'unités motrices recrutées (*c.-à-d.* sommation spatiale) et à leur fréquence de décharge (*c.-à-d.* sommation temporelle) lors d'une contraction volontaire sans pour autant permettre la distinction entre ces différentes modalités de recrutement (108).

Ces conditions ont été remplies pour 8 sujets AA, 7 sujets drépanocytaires de génotype SC et 8 sujets drépanocytaires de génotype SS.

IX.6 TEST D'EFFORT TRIANGULAIRE CONDUIT JUSQU'AU PREMIER SEUIL

VENTILATOIRE - ETUDE N°4

Ce test a été conduit dans l'étude n°4 à l'aide d'un poste de métabolisme mobile (Oxycon mobile, Jaeger, Allemagne) relié à un ordinateur pour mesurer, en cycle à cycle, la consommation d'oxygène (VO₂), la production de CO₂ (VCO₂), le débit ventilatoire (VE) et le quotient respiratoire (QR = VCO₂/VO₂). Le test d'effort triangulaire a été réalisé sur ergocycle. Durant tout le test, il a été demandé aux sujets de pédaler à une fréquence comprise entre 60 et 70 tours par minute. Le test comprenait un échauffement de 3 minutes à 10W pour les patients drépanocytaires et 20W pour les sujets contrôles puis la puissance a été augmentée toutes les minutes jusqu'à atteindre le premier seuil ventilatoire (*c.-à-d.* 5 Watts pour les femmes drépanocytaires, 7 Watts pour les hommes drépanocytaires et entre 15 et 30 Watts pour le groupe contrôle selon le sexe et le niveau d'entraînement). L'augmentation de l'intensité de l'effort utilisée chez les patients drépanocytaires se rapproche de celle qui a été utilisée par Calahan et collaborateurs (71).

Le premier seuil ventilatoire a été considéré comme atteint lorsque lorsqu'une augmentation nette du ratio VE/VO₂ (*c.-à-d.* équivalent respiratoire en O₂) a été observée sans augmentation concomitante du rapport VE/VCO₂ (*c.-à-d.* équivalent respiratoire en CO₂) (Figure 92) (403). La difficulté était de détecter l'apparition du seuil en temps réel. Ainsi la survenue d'un QR de 1 a aidé dans la prise de décision. Chez quelques patients, une minute d'exercice supplémentaire a été réalisée après l'atteinte du seuil. L'arrêt de l'exercice au premier seuil ventilatoire a été retenu afin d'éviter toute complication clinique qui résulterait d'une accumulation d'acide lactique (la diminution du pH est un facteur favorisant la polymérisation de l'hémoglobine S).



Figure 92. La méthode de Wasserman a été utilisée pour la détection en temps réel du premier seuil ventilatoire (SV1) (403). Le premier seuil ventilatoire a été considéré comme atteint lorsqu'une augmentation nette du ratio VE/VO₂ a été observée sans augmentation concomitante du rapport VE/VCO₂. Dans ces conditions, l'augmentation de VE/VO₂, indique 242

que l'élévation de la ventilation (VE) pour éliminer le CO_2 est disproportionnée par rapport aux besoins de l'organisme en O_2 .

IX.7 STATISTIQUES

IX.7.1 ETUDE N°1

L'étude n°1 comprend comme variable dépendante (moyenne ± écart type) :

- des variables anthropométrique et physiologiques : Poids, taille, âge, pourcentage d'hémoglobine S, d'hémoglobine foetale, nombre de palier qui ont été nécessaires pour atteindre le premier seuil ventilatoire, la VO₂, VCO₂, V_E, V_E/VO₂, V_E/VCO₂, le quotient respiratoire, la puissance, la pression artérielle moyenne et la fréquence respiratoire atteinte au premier seuil ventilatoire ainsi que la saturation artérielle transcutanée en oxygène. Ces variables ont été comparées (à l'exception de l'hémoglobine S) entre les sujets AA et SS à l'aide d'un test de student.
- des variables hématologiques et hémorhéologiques : nombre de leucocytes, polynucléaires neutrophiles, lymphocytes, monocytes, globules rouges, le niveau d'hémoglobine, l'hématocrite, le pourcentage de réticulocytes, le nombre de plaquettes, la concentration de fibrinogène, le temps de céphaline activée, le taux de prothrombine, la viscosité sanguine, la déformabilité érythrocytaire à 3 et 30 Pa ainsi que l'agrégation et la désagrégation érythrocytaires. Ces variables ont été comparées entre les sujets AA et SS au cours du temps (repos, fin d'exercice, 12h, 36h et 60h après l'exercice) à l'aide d'une ANOVA à 2 voies à mesures répétées (+ tests de contraste.pour identifier les différences).

IX.7.2 ETUDE N°2

Dans cette étude les variables dépendantes étudiées étaient l'âge, la pression systolique, la pression diastolique, le sexe ratio, le pourcentage d'α-thalassémie, le pourcentage de patients sous hydroxyurée, la SpO₂ au repos et à la fin de l'exercice, la distance marchée, le pourcentage de la distance prédite, le pourcentage d'hémoglobine foetale, le nombre de leucocytes, de globules rouges et de plaquettes, la concentration d'hémoglobine, l'hématocrite, le volume cellulaire moyen, la teneur cellulaire moyenne en hémoglobine, le pourcentage de réticulocytes, la concentration de lactate déshydrogenase et de bilirubine totale, la viscosité sanguine, la déformabiltié érythrocytaire à 3 Pa et à 30 Pa, l'agrégation érythrocytaire et le seuil de désagrégation érythrocytaire ainsi que le taux annuel moyen de crise vaso-occlusive et de syndrome thoracique depuis la naissance. Toutes ces variables dépendantes ont été exprimées sous la forme de moyenne ± écart type.

Dans un premier temps (tableau 1 de l'article), l'ensemble des variables dépendantes a été comparé entre les sujets SC et SS à l'aide d'un test de student si la normalité (test de Kolmogorov-Smirnov) et l'homogénétité de la variance (test de Levene) étaient respectées. Le cas échéant, un test de Mann-Whitney a été réalisé.

Dans un second temps, nous avons classé les sujets SS en fonction de leur niveau d'hypoxémie : pas d'hypoxémie (SpO₂ > 98%), hypoxémie légère $95 \le SpO_2 \le 98\%$ et modérée SpO₂ < 95% (tableau 2). Ce classement n'a pas pu être réalisé chez les sujets SC chez qui l'hypoxémie au repos était absente. Puis nous avons comparé les variables dépendantes entre les groupes à l'aide d'une ANOVA à une voie (+ test post-hoc de Tukey), si la normalité et l'homogénéité de la variance étaient respectées, et le cas échéant à l'aide d'un test de Kruskall-Wallis (suivi du test de comparison multiple de Dunn). Un test de Chi² a également été utilisé pour comparer la répartition des sexes, de l' α -thalassémie, et la 244

proportion de patients sous hydroxyurée dans chaque sous-groupe. Puis, afin d'étudier la présence d'association indépendante entre les co-variables d'intérêts et le niveau d'hypoxémie de repos, nous avons réalisé une régression multivariée ordinale comprenant les variables dépendantes dont le p était inférieur à 0,2 à l'ANOVA (ou au test de Kruskall-Wallis) ou au Chi². Cependant, afin d'éviter tout effet de colinéarité nous avons retiré plusieurs co-variables de l'analyse multivariée : le nombre de globules rouges, la concentration de lactate déshydrogénase et de bilirubine totale ainsi que la déformabilité érythrocytaire à 3 Pa.

Dans un troisième temps, dans les tableaux 3 (patients SC) et 4 (patients SS), nous avons catégorisé les variables dépendantes en deux sous-groupes : présence d'une hypoxémie induite par l'exercice (chute de la SpO₂ par rapport à la valeur prise au repos \geq 3%) ou absence d'une hypoxémie induite par l'exercice (chute de la SpO₂ par rapport à la valeur prise au repos < 3%). Puis les données ont été comparées entre les deux sous-groupes chez les sujets SC (tableau 3) et chez les sujets SS (tableau 4) à l'aide d'un test de student si la normalité (test de Kolmogorov-Smirnov) et l'homogénétité de la variance (test de Levene) étaient respectées. Le cas échéant un test de Mann-Whitney a été réalisé. Enfin, les variables dont le p était inférieur à 0,2 ont été inclus dans un modèle de régression multiple binaire. Pour les patients SS (tableau 4) la distance marchée durant le test de 6 minutes a été exclue de l'analyse pour éviter un effet de colinéarité avec le pourcentage de distance prédite.

IX.7.3 ETUDE N°3

Dans cette étude, les variables dépendantes étudiées étaient l'âge, la pression artérielle moyenne, la SpO₂, le pourcentage d'hémoglobine foetale, S et C, l'hématocrite, le niveau d'hémoglobine, le pourcentage de réticulocytes, la viscosité sanguine, la déformabilité érythrocytaire à 3 et 30 Pa, l'agrégation et le seuil de désagrégation érythrocytaire, le TOI cérébral, le TOI musculaire, la VO₂ musculaire ainsi que l'activité flowmotion totale et la variabilité du flux pour les 5 bandes de fréquences. Les valeurs ont été exprimées sous forme de moyenne \pm écart type.

Toutes ces variables ont été comparées entre les groupes AA, SC et SS à l'aide d'une ANOVA à une voie (post-hoc test de Newman-Keuls), si la normalité et l'homogénéité de la variance étaient respectées, et le cas échéant à l'aide d'un test de Kruskall-Wallis (suivi du test de comparison multiple de Dunn).

Enfin, nous avons testé la présence de corrélations entre le TOI cérébral et les différentes variables dépendantes (test de corrélation de Pearson ou de Spearman, en fonction de la normalité de distribution).

IX.7.3 ETUDE N°4

Dans cette étude, les variables dépendantes étudiées étaient l'âge, la pression artérielle moyenne, la SpO₂, l'épaisseur du pli cutané, le pourcentage d'hémoglobine foetale, S et C, l'hématocrite, le nombre de leucocytes, de plaquettes et de globules rouges, le niveau d'hémoglobine, le pourcentage de réticulocytes, la viscosité sanguine, la déformabilité érythrocytaire à 3 et 30 Pa, l'agrégation et le seuil de désagrégation érythrocytaire, le TOI

musculaire, la VO₂ musculaire, le flux sanguin dans la microcirculation musculaire, la force de contraction maximale volontaire au repos et après la fin de l'exercice intermittent de handgrip, le RMS mesuré durant la contraction maximale volontaire au repos et après la fin de l'exercice intermittent de handgrip, le pourcentage de diminution de la force maximale volontaire (avant/après l'exercice intermittent de handgrip), ainsi que l'activité flowmotion totale et la variabilité du flux pour les 5 bandes de fréquences. Les valeurs ont été exprimées sous forme de moyenne ± écart type.

Toutes ces variables ont été comparées entre les groupes AA, SC et SS à l'aide d'une ANOVA à une voie (post-hoc test de Newman-Keuls), si la normalité et l'homogénéité de la variance étaient respectées, et le cas échéant à l'aide d'un test de Kruskall-Wallis (suivi du test de comparison multiple de Dunn).

Puis afin de tester les facteurs associés avec la VO₂ musculaire nous avons réalisé des corrélations entre la VO₂ musculaire et les différentes variables dépendantes (test de corrélation de Pearson ou Spearman). Enfin, les variables dont le p était inférieur à 0,2 suite aux corrélations ont été inclues dans un modèle de régression multiple linéaire afin d'identifier les variables indépendamment associées avec la VO₂ musculaire.

X. PRESENTATIONS DES ETUDES

X.1 ETUDE N°1

Delayed beneficial effect of a single short physical exercise conducted to the first ventilatory threshold on the red blood cell agregate strength in patients with sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc*; 2012, 52 (1) : 15-26. IF: 3.398

X. Waltz, M. Hedreville, S. Sinnapah, Y. Lamarre, V. Soter, N. Lemonne, M. Etienne-Julan,

E. Beltan, T. Chalabi, R. Chout, O. Hue, D. Mougenel, M.D. Hardy-Dessources, P. Connes.

Cette étude est complémentaire de celle réalisée par Balayssac-Syransy et collaborateurs qui ont testé les effets d'un exercice de 20 minutes sur ergocycle dont l'intensité correspondait à 50% de leur capacité maximale aérobie (20). Les auteurs n'observaient aucune aggravation de la viscosité sanguine et des marqueurs de la coagulation. Bien que le pourcentage de drépanocytes irréversibles ait été modérément augmenté suite à l'exercice, aucun des patients de leur étude n'a connu de complication clinique.

Néanmoins, il est à noter que dans cette étude, l'intensité de l'exercice n'a pas été individualisée. Ainsi, certains patients ont sans doute dépassé le premier seuil ventilatoire comme en témoignent une augmentation de la lactatémie moyenne et la dérive ventilatoire observée dans cette étude (20). D'autre part, les propriétés d'agrégations et de désagrégations érythrocytaires n'ont pas été mesurées et l'évolution des paramètres n'a pas été observée dans les jours qui ont suivi l'exercice, période où les risques vaso-occlusifs post effort sont les plus importants.

L'objectif de notre étude était donc de tester l'effet d'un exercice incrémental conduit jusqu'au premier seuil ventilatoire sur les paramètres hématologiques et hémorhéologiques de patients drépanocytaires de génotype SS comparé à un groupe contrôle de génotype AA. D'autre part, puisque les risques cliniques peuvent survenir dans les heures qui suivent l'exercice, ces patients ont été suivis à 12, 36 et 60 heures après la fin de l'activité physique. Les critères d'exclusions choisis ont été très restrictifs (voir partie IX.2.1) ce qui a limité la cohorte de patients éligibles suivis par l'unité transversale de la drépanocytose du CHU de Pointe-à-Pitre à 16 patients. Sur les 16 patients éligibles, 8 ont accepté de participer à l'étude (voir partie IX.2.1). Les paramètres hématologiques mesurés étaient le nombre de leucocytes, de globules rouges et de plaquettes, l'hématocrite, la concentration d'hémoglobine, le pourcentage de réticulocyte, la concentration de fibrinogène, le temps de céphaline activée et le taux de prothrombine. Les paramètres hémorhéologiques mesurés étaient le viscosité sanguine, la déformabilité érythrocytaire, l'agrégation érythrocytaire et le 249

seuil de désagrégation érythrocytaire. Enfin, durant le test incrémental conduit jusqu'au premier seuil ventilatoire, nous avons mesuré le débit ventilatoire (VE), la consommation d'oxygène (VO₂), le débit de CO₂ expiré (VCO₂), la fréquence cardiaque ainsi que la saturation transcutanée en oxygène (SpO₂).



Figure 93. Protocole de l'étude n°1. J-1 correspond au jour de la visite clinique d'inclusion à l'étude. Le sang prélevé a permis de mesurer les paramètres hématologiques et hémorhéologiques. ECG = électrocardiogramme.

Les résultats montrent que le premier seuil ventilatoire est plus faible chez les patients SS que chez les contrôles AA. D'autre part, les ratios VE/VO₂ et VE/VCO₂ étaient plus élevés chez les patients SS par rapport au groupe contrôle suggérant une inefficience respiratoire. Le profil hémorhéologique de base était très altéré chez les SS par rapport aux AA (déformabilité érythrocytaire réduite et seuil de désagrégation érythrocytaire élevé). Les paramètres hématologiques et hémorhéologiques n'ont pas subi d'évolution différente chez les sujets SS comparés aux sujets AA. Certains paramètres, comme le nombre de leucocytes et l'agrégation érythrocytaire, ont augmenté chez les sujets SS et AA immédiatement après l'exercice par rapport aux valeurs de repos. Cependant, ces valeurs sont retournées au niveau basal 12h après l'exercice. Enfin, nous avons observé dans cette 250

étude, une diminution retardée du nombre de plaquettes et du seuil de désagrégation érythrocytaire 36 et 60h après la fin de l'exercice chez les patients SS uniquement.

Ces résultats confirment que les capacités à l'exercice des sujets drépanocytaires sont réduites (20, 71, 234, 254) chez les patients drépanocytaires avec un premier seuil ventilatoire plus faible que chez les sujets AA. Plusieurs causes de cette réduction des capacités aérobies ont été avancées dont une limitation périphérique des capacités musculaires (71). Cette hypothèse a été partiellement testée dans l'étude n°4. Par ailleurs, les paramètres hématologiques et hémorhéologiques sont peu ou pas du tout affectés par ce type d'exercice. Ceci montre qu'un exercice physique de courte durée (<15 minutes) n'est pas dangereux, sur le plan hématologique/hémorhéologique et hémostatique pour les patients drépanocytaires. En outre, nous avons également observé un effet potentiellement bénéfique pour les drépanocytaires, avec une diminution du seuil de désagrégation érythrocytaire. Ce seuil représente la force minimale nécessaire pour séparer les agrégats érythrocytaires. La diminution du seuil de désagrégation érythrocytaire pourrait avoir un effet très bénéfique au niveau de la microcirculation. Par exemple, nous avons montré récemment qu'un seuil de désagrégation érythrocytaire élevé était un facteur de risque de syndrome thoracique aigu chez l'enfant (220). Dans notre étude, la diminution de ce seuil suivait la même tendance que la diminution du nombre de plaquettes. Bien que des agrégats plaquette-érythrocyte puissent se former (416) aucune corrélation n'a été observée entre ces deux paramètres.

Enfin, il est à noter que chez un des patients, une hypoxémie importante induite par l'exercice a été observée avec une chute significative de la SpO₂ de 11%. Le suivi clinique et physiologique des sujets drépanocytaires lors d'un exercice est indispensable.

251

Delayed beneficial effect of acute exercise on red blood cell aggregate strength in patients with sickle cell anemia

Xavier Waltz^{a,b}, Mona Hedreville^b, Stéphane Sinnapah^b, Yann Lamarre^a, Valérie Soter^c, Nathalie Lemonne^d, Maryse Etienne-Julan^d, Eric Beltan^{b,e}, Tawfik Chalabi^{b,e}, Roger Chout^e, Olivier Hue^b, Danièle Mougenel^d, Marie-Dominique Hardy-Dessources^a and Philippe Connes^{a,b,*}

^aInserm U665, French West Indies and Guiana University, Pointe-à-Pitre, France ^bLaboratory ACTES (EA 3596), Department of Physiology, French West Indies and Guiana University, Pointe-à-Pitre, France

^cDirection of Research and Innovation, Academic Hospital of Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, France ^dSickle cell Center, Academic Hospital of Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, France ^cDepartment of Hematology, Academic Hospital of Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, France

Abstract. Because of the metabolic changes induced by a physical activity, the hemorheological properties of patients with sickle cell anemia could be further impaired and increase the risks for vaso-occlusive complications. However, few studies suggest that moderate physical activity could be beneficial rather than harmful in patients with sickle cell anemia (SCA). However, the definition of what can be considered as a moderate physical activity in SCA patients is imprecise. The present study tested the effects of a short incremental cycling exercise test conducted until the first ventilatory threshold on different biomarkers. Hematological and hemorheological parameters were compared between 8 patients with SCA and 13 healthy subjects (CONT) before, immediately after the end of the exercise and at 12, 36 and 60 hours after the exercise. We observed no significant hematological or hemorheological alteration induced by the exercise in the two groups. However, the exercise resulted in a delayed improvement of the red blood cell disaggregation threshold at 36 and 60 hrs after exercise in the SCA group which was paralleled to the decrease in the platelet count in this group. The present study suggests that such an exercise might be beneficial for microcirculatory blood flow.

Keywords: Physical activity, red blood cell aggregation, red blood cell deformability, sickle cell disease

1. Introduction

Sickle cell anemia (SCA) is the most common genetic disease in the world [3]. SCA may be accompanied by a myriad of complications, such as painful vaso-occlusive crisis, acute chest syndrome, splenic sequestration, etc. Several environmental and physiological factors such as hypoxia, lactic acid

1386-0291/12/\$27.50 © 2012 - IOS Press and the authors. All rights reserved

^{*}Corresponding author: Philippe Connes, Inserm U665, French West Indies and Guiana University, Pointe-à-Pitre, France. Tel.: +33 590 590 83 48 99; Fax: +33 590 590 83 05 13; E-mail: pconnes@yahoo.fr.
accumulation, dehydration and hyperthermia may promote the polymerization of the abnormal hemoglobin (i.e. HbS) and hence, red blood cell (RBC) sickling. These rigid RBCs fail to move through the small blood vessels, hence blocking local blood flow in the microvasculature [23].

Since physical activity may induce wide metabolic changes that can potentially precipitate vasoocclusive crises [23] or marked hemolysis [32], health care professionals are sometimes reluctant to encourage SCA patients to practice a physical activity [23]. But regular physical activity has been demonstrated to be benefic in several chronic diseases, such as in diabetes or asthma, and few data support that it could be the case for patients with SCA too [1, 38]. However, the duration and exercise intensity level that could be safely recommended in SCA population are imprecise [23].

Recently, Balayssac-Siransy et al. [9] tested the effects of a mild-moderate exercise of 20 min duration on the blood rheology of SCA patients. On the whole, the hemorheological changes were very mild and no medical complication occurred in any of the SCA patients leading to the conclusion that SCA patients may practice physical activity continuously for 20 min with a limited risk of vaso-occlusive complications. However, the exercise intensity level used in this study was not individualized for each SCA patient since all the SCA patients exercised at the same absolute workload (i.e. 40-45 W) than the healthy control group, corresponding approximately to 50% of their maximal aerobic power output. The occurrence of the first ventilatory threshold (VT1) during exercise represents a metabolic transition from aerobic to anaerobic metabolism. In SCA patients, VT1 may range between 35-60% of their maximal aerobic power [5, 19]. Indeed, it can be speculated that some patients from the study of Balayssac-Syransy et al. [9] exercised above their individualized VT1 whereas the remaining ones exercised below their VT1. Above VT1, exercising muscles produce more and more lactic acid which, when released into blood circulation, may decrease blood pH. That may be a concern for SCA patients since accumulation of lactic acid into blood could promote HbS polymerization and RBC sickling. Indeed, one could recommend SCA patients to exercise below or at the level of their individualized VT1. However, no study has tested the safety of using VT1 exercise intensity in SCA population yet. Before the establishment of accurate exercise programs in SCA can be possible, there is a need to test the exercise type that SCA patients could be able to sustain without any risks of vaso-occlusive and medical complication.

The present study was conducted to test the effects of a progressive cycling exercise, conducted until the VT1, on blood rheology and hematology. We compared the biological responses between a group of SCA patients and a group of healthy subjects before and after the progressive submaximal exercise bout. Because the occurrence of hemorheological impairment and vaso-occlusive complications may be delayed after exercise, biological parameters were also analyzed at 12 hrs, 36 hrs and 60 hrs after the test.

2. Material and methods

2.1. Patients

Eight patients with SCA (4 males and 4 females, age: 33.6 ± 3.6 yrs, weight: 61.4 ± 4.5 kg, height: 171.8 ± 2.9 cm, HbS: $85.8 \pm 1.8\%$ and fetal Hb: $6.7 \pm 1.8\%$) and a control group of 13 subjects with normal Hb (7 males and 6 females, age: 34.9 ± 2.1 yrs, weight: 77.3 ± 3.6 kg and height: 173.9 ± 2.3 cm) agreed to participate in the present study. All the SCA patients recruited are regularly followed by the sickle cell unit of the Academic Hospital of Pointe-à-Pitre (Pointe-à-Pitre, Guadeloupe) and were in

steady state condition at the time of the study. The patients considered with severe disease were excluded. A patient was considered as severely affected when at least one of the following conditions was present during the last five years: more than three hospitalizations per year for vaso-occlusive crisis, more than two chest syndromes per year, a passage in an intensive care unit, and more than one transfusion per year. Therefore, the results obtained in the present study can be applied for the less severe SCA patients. Other exclusion criteria included: presence of other hemoglobinopathy including α - or β -thalassemia, cardiovascular disorders, pulmonary hypertension, diabetes, body mass index (BMI) \geq 30, smoking, pregnancy, and hydroxyurea therapy.

Before enrollment, all patients and control subjects had clinical examination with anthropometric measurements and underwent resting electrocardiography, echocardiography and blood pressure measurements to check for the absence of severe exercise contraindication. All participants received verbal and written explanation of the objectives and procedures of the study and subsequently provided written informed consent. The study was approved by the Regional Ethics Committee (CPP Sud-Ouest Outre-Mer III, Bordeaux, France; Registration number: SNAD - 2010-A00126-33). The experiments were performed in accordance with the guidelines set by the Declaration of Helsinki.

2.2. Protocol

The experiment included five visits: the day before the acute exercise (D-1), the acute exercise visit (D0) and, 12 hrs (D1), 36 hrs (D2) and 60 hrs (D3) after the exercise. For each visit, a physician performed a clinical exam and venous blood was sampled in sitting position from the antecubital vein of the non-dominant arm to perform hematological and hemorheological measurements. Except for D0, blood was sampled in resting conditions. Subjects were asked to refrain from alcohol consumption but to not modify their habits of lives from the 3 days before D-1 and until the end of experiment.

2.3. Acute exercise protocol

The two groups were submitted to an incremental exercise test performed on a cycloergometer until they reached their VT1. The laboratory was air-conditioned (room temperature 23-25°C, hygrometry 50%). Clinical monitoring at rest and during exercise was made possible by the use of an earlobe pulse oxymetrer (Nonin Xpod 3011, PureSAT, USA), a 10-lead electrocardiograph (Hellige, Marquette Medical Systems, Germany) and arterial pressure monitor to follow the transcutaneous oxygen saturation (SpO₂), heart rate (HR) and mean arterial pressure (MAP), respectively. MAP was obtained from systolic and diastolic pressures such as: MAP = 1/3 systolic pressure + 2/3 diastolic pressure. Gas exchanges (oxygen consumption: VO₂; carbon dioxide production: VCO₂), ventilation (V_E) and respiratory exchange ratio (RER: VCO₂/VO₂) were measured using a breath-by-breath automated exercise metabolic system (Oxycon Mobile, Jaeger, Germany). The cycling exercise test consisted of 3 minutes warm-up at 10 W in SCA patients and 20 W in controls, and then, the load was increased every minute (i.e. SCA patients: 5-7 W; control subjects: 15-30 W) until VT1 was reached. The power increment used for SCA patients was close to the one used by Callahan et al. [19]. VT1 was considered to be reached when a net increase of the ratio V_E/VO₂ was observed while V_E/V_{CO2} remained stable or slightly decreased. After reaching the VT1, blood was immediately sampled from an antecubital vein (D0) and the subjects recovered actively by pedaling for 3 minutes at the same exercise intensity than warm-up intensity. After the test, we checked up that every subject effectively reached their VT1 using the V-slope method of Beaver et al. [15]. The V-slope method consists of plotting VCO₂ against VO₂ to identify a steep rise in VCO₂ in comparison

with the rise in VO_2 with increasing intensity. Pedaling speed remained constant at 60–70 rotation per minute during the exercise test.

2.4. Hematological parameters

Hematocrit (Hct) was measured after blood microcentrifugation at 9500 g for 10 min (JOUAN-HEMA-C, Saint Herblain, France). Total counts of leukocytes, polynuclear neutrophils, monocytes, lymphocytes, platelets and red blood cells (RBCs), percentage of reticulocytes and hemoglobin concentration (Hb) were determined from the blood sampled in EDTA tubes at D-1, D0, D1, D2, D3, using a hematology analyzer (Max M-Retic, Coulter, USA). Prothrombin ratio (PR), plasma fibrinogen concentration and activated partial thromboplastin time (aPTT) were measured on a Behring Coagulation System (Dade-Behring, Marburg, Germany) using appropriate reagents.

2.5. Hemorheological parameters measurement

Hemorheological parameters were measured within the four hours after sampling and after full reoxygenation of blood for 10–15 min as recommended [11]. Blood viscosity (η b) was measured at native hematocrit at room temperature ($\approx 25^{\circ}$ C) using a cone-plate viscometer (Brookfield DVII+ with CPE40 spindle) at 225 s⁻¹. The RBC elongation index (EI) values were determined at two shear stresses (3 and 30 Pa) by laser diffraction analysis (ecktacytometry) and at 37°C, using the Laser assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA, RR Mechtronics, Hoorn, The Netherlands). The system calculates an average RBC EI. The higher this index, the more deformable the RBCs. RBC aggregation was determined at 37°C via syllectometry (i.e. laser backscatter versus time), using the LORCA (RR Mechtronics, Hoom, The Netherlands), after adjustment of Hct to 40%. The system calculates an aggregation index (AI). The disaggregation threshold (γ thr) – i.e. the minimal shear rate needed to prevent aggregation or to break down existing aggregates – was determined using a re-iteration procedure. Hemorheological measurements were performed according to the recent guidelines for hemorheological laboratory techniques [11].

2.6. Statistics

The results are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Anthropometric and physiological parameters were compared between the 2 groups using an unpaired Student *t* test. The time courses of hematological and hemorheological data were compared between the two groups using a two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures. Pair-wise contrasts were used when necessary to locate where significant differences occurred. The significance level was defined as p < 0.05. Analyses were conducted using Statistica (v. 5.5, Statsoft, Tulsa, OK, USA).

3. Results

3.1. Physiological parameters

Resting physiological parameters were not different between the two groups except that the SCA group exhibited lower MAP than the CONT group related to a lower diastolic pressure (data not shown). The post-exercise physiological parameters are summarized in the Table 1 and Fig. 1. The average number

CONT	SCA
5.8 ± 0.7	7.4 ± 0.9
21.1 ± 3.0	$13.7\pm2.0^{\dagger}$
21.8 ± 3.3	$13.8 \pm 2.1^{\dagger}$
43.2 ± 4.5	$25.1\pm2.9^{\dagger}$
27.6 ± 1.6	$31.5\pm1.0^{\dagger}$
27.1 ± 1.6	$31.6 \pm 1.1^{\dagger}$
1.02 ± 0.02	1.0 ± 0.01
117 ± 17	$54\pm6^{\dagger}$
101.2 ± 4.4	100.6 ± 5.2
134 ± 4	135 ± 7
99.6±0.2	$96.1 \pm 1.7^{\dagger}$
	$\frac{\text{CONT}}{5.8 \pm 0.7}$ 21.1 ± 3.0 21.8 ± 3.3 43.2 ± 4.5 27.6 ± 1.6 27.1 ± 1.6 1.02 ± 0.02 117 ± 17 101.2 ± 4.4 134 ± 4 99.6 ± 0.2

 Table 1

 Exercise physiological parameters at the end of exercise (VT1) in the SCA and CONT groups

Values represent mean \pm SEM. VO₂ = oxygen uptake; VCO₂ = carbon dioxide production; V_E = minute ventilation; RER = respiratory exchange ratio (VCO₂/VO₂); MAP = mean arterial pressure; HR = heart rate; SpO₂ = transcutaneous oxygen saturation. Different from control group (p < 0.05).



Fig. 1. Transcutaneous oxygen saturation (SpO_2) at rest (D-1) and at the end of exercise (D0) in the CONT (1A) and SCA (1B) groups. Several individuals in each group overlap.

of increment to reach the VT1 was not significantly different between the two groups. At the end of exercise – i.e. when subjects reached their VT1 – power output, VO₂, VCO₂, V_E and SpO₂ were lower in the SCA group than in the CONT group. In contrast, V_E/VCO_2 and V_E/VO_2 at VT1 were increased in the SCA group in comparison with the CONT group. No difference between the two groups was observed for RER, MAP and HR values. Regarding the effect of exercise on SpO₂, no statistical change was observed in the CONT group between rest and VT1 and none of the CONT subjects developed exercise-induced hypoxemia (i.e. a fall in SpO₂ >4% [22]; Fig. 1A). In the SCA group, the decrease of the mean SpO₂ between rest and VT1 did not reach 4% but when we looked at the individual changes, one subject exhibited a fall of 11% demonstrating significant acute hypoxemia at the end of the exercise (Fig. 1B).

3.2. Hematological parameters

The hematological parameters are summarized in the Table 2. Leukocytes, polynuclear neutrophils, lymphocytes and monocytes counts were significantly higher in the SCA group than in the CONT group

		D-1	D0	D1	D2	D3
Leukocytes	CONT	5.3 ± 0.5	$6.7 \pm 0.7^{*}$	5.1 ± 0.6	4.9 ± 0.5	5.3 ± 0.6
(10 ⁹ /L)	SCA	$9.5\pm0.7^{\dagger}$	$12.2\pm0.7^{\dagger*}$	$10.3\pm0.6^{\dagger}$	$9.7\pm0.6^{\dagger}$	$10.2\pm0.6^{\dagger}$
Polynuclear	CONT	2.78 ± 0.39	3.56 ± 0.48	2.80 ± 0.47	2.50 ± 0.40	2.83 ± 0.47
Neutrophils (109/L)SCA	$4.53\pm0.55^{\dagger}$	$5.90\pm0.96^{\dagger*}$	$4.74\pm0.54^{\dagger}$	$4.65\pm0.59^{\dagger}$	$4.95\pm0.62^{\dagger}$
Lymphocytes	CONT	1.91 ± 0.19	$2.45 \pm 0.20^{*}$	1.71±0.18	1.89 ± 0.18	1.88 ± 0.21
(10 ⁹ /L)	SCA	$3.24\pm0.26^{\dagger}$	$4.39 \pm 0.35^{\dagger *}$	$3.61 \pm 0.26^{\dagger}$	$3.36\pm0.21^{\dagger}$	$3.46\pm0.19^{\dagger}$
Monocytes (109/L)	CONT	0.42 ± 0.03	0.51 ± 0.05	0.38 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.04
	SCA	$1.25\pm0.01^{\dagger}$	$1.50 \pm 0.13^{\dagger *}$	$1.43 \pm 0.13^{\dagger *}$	$1.31\pm0.10^{\dagger}$	$1.36\pm0.15^{\dagger}$
RBCs (10 ¹² /L)	CONT	4.73 ± 0.13	$5.03 \pm 0.11^{*}$	4.87 ± 0.15	4.97 ± 0.10	4.92 ± 0.13
	SCA	$2.87\pm0.19^{\dagger}$	$3.09 \pm 0.23^{\dagger}$	$2.85\pm0.24^{\dagger}$	$2.96\pm0.18^{\dagger}$	$3.00\pm0.19^{\dagger}$
Hb (g/dL)	CONT	13.7 ± 0.3	$14.7 \pm 0.3^{*}$	14.1 ± 0.3	13.5 ± 1.0	14.2 ± 0.3
	SCA	$8.0\pm0.5^{\dagger}$	$8.8 \pm 0.6^{\dagger *}$	$8.0\pm0.6^{\dagger}$	$8.3\pm0.5^{\dagger}$	$8.0\pm0.7^{\dagger}$
Hct (%)	CONT	43.9 ± 0.7	44.5 ± 0.9	$42.9\pm0.9^*$	43.5 ± 0.8	43.7 ± 0.9
	SCA	$25.6\pm1.4^{\dagger}$	$26.6 \pm 1.4^{\dagger}$	$26.4 \pm 1.3^{\dagger}$	$25.9\pm1.4^{\dagger}$	$25.8\pm1.4^{\dagger}$
Reticulocytes (%)	CONT	1.14 ± 0.15	1.10 ± 0.16	1.14 ± 0.17	1.15 ± 0.19	1.20 ± 0.19
	SCA	$12.19 \pm 1.68^\dagger$	$11.56 \pm 1.90^{\dagger}$	$11.70\pm1.74^{\dagger}$	$11.53 \pm 1.77^\dagger$	$11.39 \pm 1.59^\dagger$
Platelets count	CONT	282 ± 22	280 ± 29	264 ± 22	245 ± 26	271 ± 22
$(10^{9}/L)$	SCA	$458\pm52^{\dagger}$	$430\pm54^{\dagger}$	$456\pm41^{\dagger}$	$394\pm64^*$	$386\pm58^*$
Fibrinogen (g/L)	CONT	2.9 ± 0.2	3.1 ± 0.2	2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.9 ± 0.2
	SCA	2.7 ± 0.2	$3.4 \pm 0.2^{*}$	2.9 ± 0.1	$3.3 \pm 0.2^*$	$3.1\pm0.2^*$
PR (%)	CONT	95.1 ± 2.1	93.5 ± 2.2	93.6 ± 1.6	98.0 ± 1.2	97.9 ± 1.3
	SCA	$75.6 \pm 7.3^{\dagger}$	$78.6\pm5.7^{\dagger}$	$76.0\pm4.8^{\dagger}$	$79.4\pm7.0^{\dagger}$	$84.5\pm5.3^{\dagger}$
aPPT (sec)	CONT	35.9±1.7	34.8±1.9	36.2 ± 1.8	34.7 ± 1.8	35.3 ± 2.0
	SCA	34.5 ± 2.2	34.3 ± 1.9	34.6 ± 1.8	33.7 ± 1.9	33.8 ± 1.5

 Table 2

 Hematological data at rest (D-1), end of exercise (D0) and during recovery (12 hrs = D1; 36 hrs = D2; 60 hrs = D3) in the SCA and CONT groups

Values represent mean \pm SEM. RBCs = red blood cells; Hb = hemoglobin concentration; Hct = hematocrit; PR = prothrombin ratio; aPPT = activated partial thromboplastin time. [†]Different from control group (p < 0.05); ^{*}different from D-1 (p < 0.05).

at every time. At D0, an increase of leukocytes, polynuclear neutrophils (p = 0.06 in the CONT group) and lymphocytes count was observed in both groups in comparison with baseline. Monocytes count was not affected by exercise in the CONT and increased over baseline at D0 and D1 in the SCA group.

SCA patients were characterized by lower RBCs count, Hb and Hct levels, and higher reticulocytes percentage in comparison with the CONT group. Exercise significantly increased the Hb level over resting level in both groups. The increase in RBCs count at D0 was significant in the CONT group only. Hct level was slightly but significantly decreased below baseline level at D1 in the CONT group.

SCA and CONT groups were not different regarding aPPT but PR was significantly reduced in the SCA group in comparison with the CONT group. A slight but significant increase in fibrinogen concentration over baseline level was observed at D0, D2 and D3 in the SCA group but the two groups were not significantly different at any time. As shown in Table 2, platelets count was significantly higher in the SCA group than in the CONT group at D-1, D0 and D1. At D2 and D3, platelets count decreased below baseline level in the SCA group with values becoming not significantly different from the CONT group.

3.3. Hemorheological parameters

The hemorheological parameters are summarized in the Table 3 and Fig. 2. A technical problem deprived us of ηb determination for four volunteers in the CONT group. ηb was not changed by exercise in the two groups and was different between the two groups at D-1 and D1. EI (at 3 and 30 Pa) and AI were significantly reduced in the SCA group in comparison with the CONT group. Exercise did not change EI in the two groups and EI remained very close to the baseline level during recovery, except a very slight (but is not physiologically relevant) decrease in EI determined at 30 Pa at D1 in the CONT group only. The time course of AI was similar in both groups with AI increasing above baseline at D0 and returning to resting level during the recovery. As shown on Fig. 2, γ thr was significantly higher in SCA patients than in the CONT group at D-1, D0 and D1. At D2 and D3, γ thr decreased below baseline in the SCA group but values were still higher in the SCA group compared to the CONT group.



Hemorheological parameters at rest (D-1), end of exercise (D0) and during recovery (12 hrs = D1; 36 hrs = D2; 60 hrs = D3) in the SCA and CONT groups

		D-1	DØ	. D1	D2	D 4
		D-1	00	DI	D2	D3
ηb (mPa/s)	CONT	5.19 ± 0.18	5.60 ± 0.19	4.95 ± 0.15	5.24 ± 0.17	5.57 ± 0.36
	SCA	$6.18\pm0.37^{\dagger}$	6.50 ± 0.43	$6.02\pm0.34^{\dagger}$	5.85 ± 0.27	6.07 ± 0.26
EI at 3 Pa	CONT	0.346 ± 0.009	0.333 ± 0.008	0.329 ± 0.010	0.333 ± 0.006	0.349 ± 0.007
	SCA	$0.156 \pm 0.021^{\dagger}$	$0.141 \pm 0.023^{\dagger}$	$0.150\pm0.020^{\dagger}$	$0.150\pm0.022^\dagger$	$0.144\pm0.020^{\dagger}$
EI at 30 Pa	CONT	0.599 ± 0.003	0.586 ± 0.004	$0.584 \pm 0.005^{*}$	0.583 ± 0.004	0.595 ± 0.003
SC	SCA	$0.383 \pm 0.037^{\dagger}$	$\textbf{0.367} \pm 0.036^{\dagger}$	$0.369\pm0.033^{\dagger}$	$0.375\pm0.033^\dagger$	$0.368\pm0.037^{\dagger}$
AI (%) CONT SCA	CONT	65.1 ± 2.0	$67.2 \pm 1.9^{*}$	65.0 ± 2.3	65.1 ± 1.6	64.4 ± 2.1
	SCA	$53.4 \pm 2.3^{\dagger}$	$56.2 \pm 2.2^{\dagger *}$	$54.4\pm2^{\dagger}$	$53.7\pm2.1^{\dagger}$	$54.2\pm2.3^{\dagger}$

Values represent mean \pm SEM. ηb = blood viscosity; EI = Elongation Index (i.e. RBC deformability); AI = Aggregation Index. [†]Different from control group (p < 0.05); [†]different from D-1 (p < 0.05).



Fig. 2. Red blood cell disaggregation threshold (γ thr) at rest (D-1), end of exercise (D0) and during recovery (12 hrs = D1; 36 hrs = D2; 60 hrs = D3) in the SCA and CONT groups. [†]Different from control group (p < 0.05); ^{*}different from D-1 (p < 0.05).

4. Discussion

The present study showed that a short incremental exercise conducted until the VT1 did not result in further impairment of the hemorheological profile in the SCA group. In addition, this short exercise resulted in a delayed improvement of the red blood cell disaggregation threshold at 36 hrs and 60 hrs after exercise in the SCA group.

The exercise duration required to reach the VT1 was not different between the two groups suggesting a similar physiological stress induced by the exercise in the two populations. Despite the fact that the cardiovascular strain induced by the effort was close between SCA and CONT groups (i.e. HR and MAP were not different between the two groups at VT1), the lower power output and VO₂ reached by the SCA group at VT1 confirms that SCA patients have reduced aerobic capacity as it has been demonstrated in the past [9, 29, 30]. The marked chronic anemia contributes to the limited exercise capacity of SCA patients [19] but other causes such as cardiovascular impairment, limited lung function or muscle peripheral limitation have been hypothesized to be involved too [19, 24]. Although the V_E reached at VT1 in the SCA group was lower than in the CONT group, the higher V_E/VCO₂ and V_E/VO₂ at VT1 in the SCA group in comparison with the CONT group clearly indicates ventilatory inefficiency in SCA patients that can be involved in the limited aerobic physical fitness of these patients. We did not report data on lung function in our group of SCA patients but it appears that around 40-50% of the SCA population is marked by restrictive lung function [9, 37] that can contribute to the limited ventilatory efficiency during exercise in this population and could explain why one SCA patient experienced exercise-induced hypoxemia. This finding suggests that accurate clinical monitoring of SCA population during exercise, with SpO2 measurement, is essential. Nevertheless, despite the reduced aerobic capacity and relative ventilatory efficiency, none of the SCA patients complained of any difficulty during the whole test and none of them exhibited clinical signs of vaso-occlusive complication. The SCA patient who developed hypoxemia at the end of the exercise was not different from the other SCA patients regarding the physiological, hematological and hemorheological parameters explored in this study. Further studies are clearly needed to better understand why few SCA patients could develop exercise-induced hypoxemia and to limit the potential complications that could occur if hypoxemia duration was longer.

The baseline hematological profile of the SCA group was very similar to the hematological profile usually described in sickle cell patients [36] i.e. thrombocytosis and leucocytosis [26, 28], low Hb and Hct levels with reticulocytosis (i.e. chronic hemolytic anemia), normal aPPT and slightly decreased PR [8, 33]. Except for η b, resting blood rheological values of our SCA group were very close to the values previously reported, with RBC deformability and aggregation being reduced and RBC disaggregation threshold being abnormally elevated in the SCA group as compared with the CONT group [39]. The RBC aggregation properties of SCA patients are very different from the RBC aggregation characteristics of patients with metabolic syndrome or hyperinsulinemia who are characterized by increased RBC aggregation in comparison to healthy population [18, 41]. Further studies are needed to better understand the reason of decreased RBC aggregation but increased RBC aggregates strength in SCA patients. The lower RBC aggregation could be related to the reduced RBC deformability [12], metabolic depletion [34] or oxidative stress [14].

In this study, the resting ηb of our SCA patients was 49% higher than the resting ηb reported in the study of Tripette et al. [39]. Since patients of the SCA group were in steady-state conditions, this cannot be related to the occurrence of vaso-occlusive crises. This difference might be due to the reduced sample size in our study and the important variability usually found in the hemorheological profile of SCA population.

23

The increase of leukocytes induced by exercise in the two groups was related to the increase of the different leukocytes types and is a normal response usually occurring in healthy subjects [40]. This could indicate a slight inflammatory response and/or leukocytes recruitment from the marginal pool following the catecholaminergic stress of exercise [43]. Although the slight increase in leukocytes count could increase the risks for blood flow impairment and abnormal vascular adhesion processes in SCA patients, the values rapidly returned to baseline level during the recovery period (i.e. D1, D2 and D3) that probably limits the clinical impact of these acute changes. Platelets count was not affected by exercise in both groups but, surprisingly, we observed a delayed decrease of this parameter 36 and 60 hrs after the exercise in the SCA group. The reason of this finding is unknown, and was not observed in the CONT group. On one side, the decrease in platelets count could protect SCA patients from complications since platelets are considered to be potentially involved in vaso-occlusion through their abilities to adhere to the endothelium and sickle RBCs [42]. However, the decreased platelet level might be associated to an increase of platelet activation as described by Lehmann et al. [27] who observed that high altitude exposure caused platelet activation resulting in a decrease of platelets count in the peripheral blood. It could be possible that some activated platelets remained deposited at sites of vascular injury or subclinical vaso-occlusion [6] in response to exercise. Although platelet activation is known to occur immediately after exercise [20], we have not observed a decrease of platelets count immediately after exercise but 2 and 3 days after the exercise stopped. Nevertheless, platelet sequestration could have occurred in the pulmonary capillaries in reaction to the small hypoxia generated by exercise [25, 31] or in other vascular sites. The clinical follow-up immediately and few days after exercise did not support any clinical complications, suggesting that the hypothetical platelet sequestration could have been of limited magnitude. Further works are clearly needed to better understand the underlying mechanisms of the delayed platelets consumption after exercise.

Although hemorheological parameters cannot fully explain or predict the occurrence of vaso-occlusive crises, several studies observed a strong rise in blood viscosity concomitant with vaso-occlusive events [7, 21, 35] and in relationship with other biological changes such as an increase in plasma viscosity and fibrinogen concentration and/or a decrease in RBC deformability corresponding to the increase in the number of dense cells [10]. The exercise proposed in this study did not significantly change mb in the SCA group, as well as in the CONT group. The slight non-significant yb change observed is in accordance with the data recently reported in the study of Balayssac-Syransy et al. [9] who submitted a group of SCA patients to a prolonged submaximal exercise of 20 min duration at 50 W. Unfortunately, it was not possible to determine $\nabla T1$ in the study of Balayssac-Syransy et al. [9] and the proportion of SCA patients exercising above VT1 and below VT1 is not known. But amazingly SCA patients of the present study reached their VT1 at a power output of 54 ± 6 W that is very close to the poweroutput sustained for 20 min in the study of Balayssac-Syransy et al. [9]. Thus both studies support that exercising for 20 min at an intensity corresponding to the VT1 does not cause a dramatic change in yb and Hct. Moreover, in the present study, post-exercise yb (D1, D2 and D3) of the SCA group remained close to the baseline value, excluding the presence of an increased vaso-occlusion risk related to blood hyperviscosity complications. To strengthen our conclusion, we also calculated the ratio of Hct to nb (HVR; data not shown), which is considered to be an index of RBC oxygen transport effectiveness [2, 16, 39]. As previously demonstrated [39], resting HVR was lower in SCA patients compared to the CONT group but no change occurs with exercise in both groups. In addition, as compared to the study of Balayssanc-Syransy et al. [9], the present study allowed accurate measurements of RBCs rheological properties such as RBC aggregation measurement and direct determination of RBC deformability. The present study clearly demonstrated that an exercise conducted until VT1 did not further impair RBC deformability in SCA patients. RBC deformability determined at low and high shear stresses remained unchanged in SCA group, as well as in the CONT group, during the whole protocol indicating the absence of increased risk for microvascular blockage. The lack of change in RBC deformability in the SCA group is also supported by the results obtained on blood smears (data not shown) where we observed a lack of change in sickle RBCs percent over the time. RBC aggregation increased with exercise in both groups and then, rapidly returned to baseline during the recovery period. This is a classical phenomenon already observed in healthy exercising sportsmen [17]. But the most interesting result of the present study is probably the delayed reduction of the RBC disaggregation threshold below baseline observed in the SCA group on D2 and D3. The elevated RBC disaggregation threshold in SCA [39] may increase flow resistance at the entry of capillaries where RBC aggregates need to be fully dispersed before they can be able of entering into, and negotiate, small capillaries [13]. Thus, the delayed RBC disaggregation threshold reduction observed in the SCA group, two and three days after the exercise bout, might be very beneficial for microcirculatory hemodynamics. RBC aggregation is strongly influenced by the plasma fibrinogen concentration. However, the time course changes observed for the RBC disaggregation threshold was very different from the time course changes of fibringen. In addition, SCA group and CONT group were not different regarding plasma fibrinogen concentration. It might be advanced that fibrinogen was not involved in the post-exercise adaptations observed for the RBC disaggregation threshold in the SCA group. In contrast, the time course changes of platelets count and of the RBC disaggregation threshold were very similar in the SCA group. Platelets have been demonstrated to be able to adhere to RBCs forming platelet-RBC aggregates [42]. Wun et al. (1997) hypothesized that thrombospondin could be involved in the bridging of platelets to RBCs but it is unknown whether the presence of platelets-RBCs aggregates increase the robustness of the whole RBCs aggregates. Although we suspect that the decrease in platelets count in SCA patients during recovery could be involved in the delayed decrease of the RBC disaggregation threshold, further works are clearly needed to delineate the relationships between these parameters.

Although conducted with a small sample size of SCA patients in a relatively healthy condition, this first set of experiments suggest that a short duration exercise with intensity lower than the VT1 intensity could be safe for SCA individuals. Nevertheless, the clinical monitoring over the time for each patient is of primary importance since SCA patients could experience a drop in SpO₂. However, the present study did not show adverse events. This kind of endurance activity could increase their level of daily functioning and decrease their microcirculatory flow abnormalities, as suggested by the reduction of the RBC disaggregation threshold after a single bout of exercise. Further studies are clearly warranted to test longer exercise duration at the VT1 intensity and to find the most appropriate training program, from a clinical risk/benefit balance point of view.

Acknowledgments

We sincerely thank the Academic Hospital of Pointe-à-Pitre for his financial support, the Nuclear Medical Unit (Mr. Mozart) and the Sickle Cell Unit. The authors also thank all the subjects who participated in the present study, the nurse (Mrs. Drymon) and Mrs. Lipau. The manuscript was written in accordance with the ethical guidelines of *Clinical Hemorheology and Microcirculation* [4].

References

- R. Alcorn, B. Bowser, E.J. Henley and V. Holloway, Fluidotherapy and exercise in the management of sickle cell anemia. A clinical report, *Phys Ther* 64 (1984), 1520–1522.
- [2] T. Alexy, S. Sangkatumvong, P. Connes, E. Pais, J. Tripette, J.C. Barthelemy, T.C. Fisher, H.J. Meiselman, M.C. Khoo and T.D. Coates, Sickle cell disease: Selected aspects of pathophysiology, *Clin Hemorheol Microcirc* 44 (2010), 155–166.
- [3] M. Angastiniotis, B. Modell, P. Englezos and V. Boulyjenkov, Prevention and control of haemoglobinopathies, Bull World Health Organ 73 (1995), 375–386.
- [4] Anonymous, Ethical guidelines for publication in Clinical Hemorheology and Microcirculation, *Clin Hemorheol Microcirc* 44 (2010), 1–2.
- [5] A. Anthi, R.F. Machado, M.L. Jison, A.M. Taveira-Dasilva, L.J. Rubin, L. Hunter, C.J. Hunter, W. Coles, J. Nichols, N.A. Avila, V. Sachdev, C.C. Chen and M.T. Gladwin, Hemodynamic and functional assessment of patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension, Am J Respir Crit Care Med 175 (2007), 1272–1279.
- [6] K.I. Ataga and E.P. Orringer, Hypercoagulability in sickle cell disease: A curious paradox, Am J Med 115 (2003), 721-728.
- [7] O.A. Awodu, A.A. Famodu, O.I. Ajayi, M.E. Enosolease, O.Y. Olufemi and E. Olayemi, Using serial haemorheological parameters to assess clinical status in sickle cell anaemia patients in vaso-occlussive crisis, *Clin Hemorheol Microcirc* 41 (2009), 143–148.
- [8] M.A. Babiker, E.F. Ashong, H. Bahakim and A.M. Gader, Coagulation changes in sickle cell disease in early childhood, Acta Haematol 77 (1987), 156–160.
- [9] E. Balayssac-Siransy, P. Connes, N. Tuo, C. Danho, M. Diaw, I. Sanogo, M.D. Hardy-Dessources, A. Samb, S.K. Ballas and P. Bogui, Mild haemorheological changes induced by a moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia, *Br J Haematol* 154 (2011), 398–407.
- [10] S.K. Ballas and E.D. Smith, Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis, *Blood* 79 (1992), 2154–2163.
- [11] O.K. Baskurt, M. Boynard, G.C. Cokelet, P. Connes, B.M. Cooke, S. Forconi, F. Liao, M.R. Hardeman, F. Jung, H.J. Meiselman, G. Nash, N. Nemeth, B. Neu, B. Sandhagen, S. Shin, G. Thurston and J.L. Wautier, New guidelines for hemorheological laboratory techniques, *Clin Hemorheol Microcirc* 42 (2009), 75–97.
- [12] O.K. Baskurt and H.J. Meiselman, Blood rheology and hemodynamics, Semin Thromb Hemost 29 (2003), 435-450.
- [13] O.K. Baskurt and H.J. Meiselman, RBC aggregation: More important than RBC adhesion to endothelial cells as a determinant of *in vivo* blood flow in health and disease, *Microcirculation* 15 (2008), 585-590.
- [14] O.K. Baskurt, A. Temiz and H.J. Meiselman, Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties, Free Radic Biol Med 24 (1998), 102–110.
- [15] W.L. Beaver, K. Wasserman and B.J. Whipp, A new method for detecting anaerobic threshold by gas exchange, J Appl Physiol 60 (1986), 2020–2027.
- [16] A.S. Bowers, D.J. Pepple and H.L. Reid, Optimal haematocrit in subjects with normal haemoglobin genotype (HbAA), sickle cell trait (HbAS), and homozygous sickle cell disease (HbSS), *Clin Hemorheol Microcirc* 47 (2011), 253–260.
- [17] J.F. Brun, E. Varlet-Marie, P. Connes and I. Aloulou, Hemorheological alterations related to training and overtraining, *Biorheology* 47 (2010), 95–115.
- [18] J.F. Brun, E. Varlet-Marie, E.R. de Mauverger and J. Mercier, Minimal model-derived insulin sensitivity, insulin secretion and glucose tolerance: Relationships with blood rheology, *Clin Hemorheol Microcirc* (2012), E-pub ahead of print. DOI: 10.3233/CH-2011-1425
- [19] L.A. Callahan, K.F. Woods, G.A. Mensah, L.T. Ramsey, P. Barbeau and B. Gutin, Cardiopulmonary responses to exercise in women with sickle cell anemia, Am J Respir Crit Care Med 165 (2002), 1309–1316.
- [20] V. Chaar, M. Romana, J. Tripette, C. Broquere, M.G. Huisse, O. Hue, M.D. Hardy-Dessources and P. Connes, Effect of strenuous physical exercise on circulating cell-derived microparticles, *Clin Hemorheol Microcirc* 47 (2011), 15–25.
- [21] S. Charache, S. de la Monte and V. MacDonald, Increased blood viscosity in a patient with sickle cell anemia, *Blood Cells* 8 (1982), 103–109.
- [22] P. Connes and J.H. Boucher, Echinocytosis in athletes with exercise-induced hypoxemia, *Clin Hemorheol Microcirc* 44 (2010), 107–114.

- [23] P. Connes, R. Machado, O. Hue and H. Reid, Exercise limitation, exercise testing and exercise recommendations in sickle cell anemia, *Clin Hemorheol Microcirc* 49 (2011), 151–163.
- [24] C. Delclaux, F. Zerah-Lancner, D. Bachir, A. Habibi, J.L. Monin, B. Godeau and F. Galacteros, Factors associated with dyspnea in adult patients with sickle cell disease, *Chest* 128 (2005), 3336–3344.
- [25] G.W. Gray, A.C. Bryan, M.H. Freedman, C.S. Houston, W.F. Lewis, D.M. McFadden and G. Newell, Effect of altitude exposure on platelets, *J Appl Physiol* 39 (1975), 648–652.
- [26] M.W. Kenny, A.J. George and J. Stuart, Platelet hyperactivity in sickle-cell disease: A consequence of hyposplenism, J Clin Pathol 33 (1980), 622–625.
- [27] T. Lehmann, H. Mairbaurl, B. Pleisch, M. Maggiorini, P. Bartsch and W.H. Reinhart, Platelet count and function at high altitude and in high-altitude pulmonary edema, J Appl Physiol 100 (2006), 690–694.
- [28] J. Leslie, D. Langler, G.R. Serjeant, B.E. Serjeant, P. Desai and Y.B. Gordon, Coagulation changes during the steady state in homozygous sickle-cell disease in Jamaica, Br J Haematol 30 (1975), 159–166.
- [29] D.M. Miller, R.M. Winslow, H.G. Klein, K.C. Wilson, F.L. Brown and N.J. Statham, Improved exercise performance after exchange transfusion in subjects with sickle cell anemia, *Blood* 56 (1980), 1127–1131.
- [30] R.M. Millis, F.W. Baker, L. Ertugrul, R.M. Douglas and L. Sexcius, Physical performance decrements in children with sickle cell anemia, J Natl Med Assoc 86 (1994), 113-116.
- [31] G.P. Pidgeon, R. Tamosiuniene, G. Chen, I. Leonard, O. Belton, A. Bradford and D.J. Fitzgerald, Intravascular thrombosis after hypoxia-induced pulmonary hypertension: Regulation by cyclooxygenase-2, *Circulation* 110 (2004), 2701–2707.
- [32] O.S. Platt, Exercise-induced hemolysis in sickle cell anemia: Shear sensitivity and erythrocyte dehydration, Blood 59 (1982), 1055-1060.
- [33] L.J. Raffini, A.E. Niebanck, J. Hrusovsky, A. Stevens, A. Blackwood-Chirchir, K. Ohene-Frempong and J.L. Kwiatkowski, Prolongation of the prothrombin time and activated partial thromboplastin time in children with sickle cell disease, *Pediatr Blood Cancer* 47 (2006), 589–593.
- [34] W.H. Reinhart and T. Schulzki, Metabolic depletion decreases the aggregability of erythrocytes, *Clin Hemorheol Microcirc* 49 (2011), 451–461.
- [35] S.G. Richardson, K.B. Matthews, J. Stuart, A.M. Geddes and R.M. Wilcox, Serial changes in coagulation and viscosity during sickle-cell crisis, Br J Haematol 41 (1979), 95–103.
- [36] G.R. Serjeant and B.E. Serjeant, Sickle cell disease, Oxford Medical Publications (Third Edition), 2001.
- [37] K.P. Sylvester, R.A. Patey, P. Milligan, M. Dick, G.F. Rafferty, D. Rees, S.L. Thein and A. Greenough, Pulmonary function abnormalities in children with sickle cell disease, *Thorax* 59 (2004), 67–70.
- [38] G. Tinti, R. Somera Jr, F.M. Valente and C.R. Domingos, Benefits of kinesiotherapy and aquatic rehabilitation on sickle cell anemia. A case report, *Genet Mol Res* 9 (2010), 360–364.
- [39] J. Tripette, T. Alexy, M.D. Hardy-Dessources, D. Mougenel, E. Beltan, T. Chalabi, R. Chout, M. Etienne-Julan, O. Hue, H.J. Meiselman and P. Connes, Red blood cell aggregation, aggregate strength and oxygen transport potential of blood are abnormal in both homozygous sickle cell anemia and sickle-hemoglobin C disease, *Haematologica* 94 (2009), 1060–1065.
- [40] J. Tripette, P. Connes, M. Hedreville, M. Etienne-Julan, L. Marlin, O. Hue and M.D. Hardy-Dessources, Patterns of exercise-related inflammatory response in sickle cell trait carriers, Br J Sports Med 44 (2010), 232-237.
- [41] A. Vaya, A. Hernandez-Mijares, E. Bonet, R. Sendra, E. Sola, R. Perez, D. Corella and B. Laiz, Association between hemorheological alterations and metabolic syndrome, *Clin Hemorheol Microcirc* 49 (2011), 493–503.
- [42] T. Wun, T. Paglieroni, F. Tablin, J. Welborn, K. Nelson and A. Cheung, Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia, J Lab Clin Med 129 (1997), 507–516.
- [43] O. Yalcin, A. Erman, S. Muratli, M. Bor-Kucukatay and O.K. Baskurt, Time course of hemorheological alterations after heavy anaerobic exercise in untrained human subjects, J Appl Physiol 94 (2003), 997–1002.

$X.2 \text{ etude } N^{\circ}2$

Hematological and hemorheological determinants of steady-state and exercise-induced hypoxemia in SCD patients. *A soumettre*.

Xavier Waltz, Marie-Laure Lalanne-Mistrih, Marc Romana, Roberto Machado, Yann Lamarre, Vanessa Tarer, Benoît Tressières, Lydia Diavialle-Doumdo, Marie Petras, Frederic Maillard, Marie-Dominique Hardy-Dessources, Maryse Etienne-Julan, Philippe Connes. Dans l'étude n°1, nous avons observé, chez les patients SS, la présence d'une hypoxémie de repos ainsi qu'un risque d'hypoxémie induite par l'exercice (HIE). Peu d'études se sont intéressées aux causes de l'hypoxémie artérielle de repos (72, 178, 321, 324, 350) et une seule à notre connaissance a étudié les causes de l'hypoxémie induite par l'exercice (HIE) (72) chez les patients atteints de la drépanocytose. L'hypoxémie artérielle au repos est un facteur de risque de complications cérébrales (206, 323) chez les drépanocytaires. La présence d'une HIE est indépendamment associée à une vitesse de régurgitation tricuspidienne élevée (*c.-à-d.* facteur de risque d'hypertension artérielle pulmonaire) (72, 257). La compréhension des mécanismes de l'hypoxémie artérielle est donc essentielle.

La réduction de la saturation artérielle en O_2 (SpO₂) mesurée par oxymétrie de pouls est fréquente chez les drépanocytaires, même en l'absence de dysfonction pulmonaire ou de maladie pulmonaire (178, 321, 324, 350). Les facteurs de risque d'une hypoxémie artérielle de repos avancés sont : un niveau d'hémoglobine bas (178, 324, 350), une affinité réduite de l'hémoglobine S pour l'oxygène (346) et une hémolyse importante (178, 201, 321, 324, 350). Les mêmes facteurs semblent être impliqués lors d'une HIE observée lors d'un test de marche (72).

Chez le sujet non drépanocytaire, nous avons vu dans la partie IV.3 que les altérations hémorhéologiques pouvaient être impliquées dans l'hypoxémie artérielle de repos et d'exercice.

Comme la drépanocytose est une pathologie où la rhéologie du sang est sévèrement altérée, l'objectif de cette étude était de tester si les altérations hémorhéologiques étaient des facteurs de risques d'hypoxémie artérielle de repos et d'exercice chez les patients SC et SS. L'étude d'une population pédiatrique a été retenue car les enfants drépanocytaires présentent une plus grande variabilité clinique permettant de faire ressortir plus facilement les facteurs de risques associés à une hypoxémie de repos ou une hypoxémie induite par l'exercice.

265

Pour ce faire nous avons testé les associations, à l'aide d'analyses multivariées, entre les facteurs de risques (*c.-à-d.* variables indépendantes) et le niveau de saturation artérielle en oxygène (SpO₂) (*c.-à-d.* variable dépendante), mesuré au repos et suite à un test de marche de 6 minutes, à l'aide d'un oxymètre de pouls. Ces associations ont été testées à partir des données obtenues chez 107 enfants drépanocytaires (50 sujets SC et 57 sujets SS). Afin de tester les facteurs de risque associés à une hypoxémie artérielle de repos, les données de la SpO₂ mesurées au repos, ont été divisées en trois catégories selon les critères de Campbell et collaborateurs (72) :

- hypoxémie artérielle absente avec une $SpO_2 \ge 98\%$,
- hypoxémie artérielle légère $95 \le SpO_2 \le 98\%$
- et modérée $SpO_2 < 95\%$.

Les résultats de SpO₂, pour l'analyse des facteurs de risques de l'hypoxémie d'exercice (HIE), ont été divisés en deux sous-groupe : absence d'HIE avec une chute de SpO₂ < 3% et présence d'une HIE avec une chute de SpO₂ \geq 3% (72). La distance parcourue par les enfants a été convertie en pourcentage de la distance prédite obtenu à partir des équations de Geiger et collaborateurs (144) (voir IX.4). Les facteurs de risques testés étaient le sexe, l'âge, la présence ou non d'une α -thalassémie, la prise ou non d'un traitement à l'hydroxyurée, le pourcentage de la distance prédite, l'hémoglobine fœtale, le nombre de globules rouges, de leucocytes, de plaquettes, l'hématocrite, la concentration d'hémoglobine, le VGM, la TCMH, les marqueurs d'hémolyses (*c.-à-d.* pourcentages de réticulocytes, lactate déhydrogénase et bilirubine totale) ainsi que les paramètres hémorhéologiques (*c.-à-d.* viscosité sanguine, déformabilité érythrocytaire, agrégations/désagrégation érythrocytaire). Dans l'analyse statistique, nous avons dissocié les deux génotypes (SS et SC). Le test de marche de 6 minutes a été retenu pour sa simplicité d'utilisation (*c-à-d.* comparé à un test d'effort calibré) et pour son faible risque clinique. D'autre part, le test de marche de 6 minutes

reflète très bien la sévérité clinique chez les drépanocytaires (72). Ci-dessous une représentation du déroulement du protocole (Figure 94).



Figure 94. Protocole de l'étude n°2. FC = fréquence cardiaque, TAS = tension artérielle systolique, TAD = tension artérielle diastolique, SpO₂ = saturation artérielle transcutanée en O_2 .

Nos résultats montrent que l'hypoxémie artérielle de repos est absente chez les sujets SC alors qu'elle est présente chez 50% des sujets SS. D'autre part, 18% des sujets SC connaissent une HIE, suite au test de marche, contre 34% pour les sujets SS. Par ailleurs, le pourcentage de la distance prédite tendait à être plus faible chez les sujets SS comparés aux sujets SC (p = 0,088). Aucune complication clinique n'a été observée suite au test de marche chez l'ensemble des enfants drépanocytaires.

Les résultats de l'analyse multivariée ne montrent aucune association indépendante entre les facteurs testés et l'HIE chez les patients SC. Concernant l'hypoxémie artérielle de repos pour les sujets SS, nous avons observé une association indépendante avec le niveau d'hémolyse et une tendance avec le niveau de déformabilité érythrocytaire (p = 0.1). L'HIE était, quant à elle, indépendamment associée au pourcentage de distance prédite, au seuil de désagrégation érythrocytaire ainsi qu'aux antécédents de syndrome thoracique aigu.

L'hypoxémie artérielle de repos n'affecte pas les enfants drépanocytaires SC alors qu'elle affecte la moitié de notre population pédiatrique de patients SS. Par ailleurs, chez les enfants

SS, l'hypoxémie artérielle de repos et l'HIE semblent ne pas impliquer les mêmes mécanismes contrairement à l'étude de Campbell et collaborateurs (72).

Concernant l'hypoxémie au repos, notre étude confirme l'association avec le niveau d'hémolyse avancée par d'autres études (178, 201, 321, 324, 350). Cependant, contrairement à d'autres études, notre cohorte de patients SS ne montre pas d'association indépendante entre un niveau d'hémoglobine bas et l'hypoxémie artérielle de repos (178, 324, 350). Ceci pourrait peut être s'expliquer par l'amélioration de la prise en charge des patients drépanocytaires ainsi que les critères d'inclusion de l'étude. En effet, dans les critères d'inclusion, seuls les enfants pris en charge régulièrement depuis leur naissance ont pu être inclus dans notre étude.

Par ailleurs, il est à noter que la déformabilité érythrocytaire tend à être indépendamment associée à l'hypoxémie artérielle de repos et ce peut-être pour les raisons invoquées en partie IV.3.

Les raisons de l'HIE chez les enfants SC n'ont pas été mises en évidence par notre étude. Pour les sujets SS, le seuil de désagrégation semble être un facteur de risque d'HIE. Ainsi, si l'on prend en compte l'étude n°1, il se pourrait que le seuil de désagrégation soit impliqué dans l'hypoxémie induite par l'exercice. L'association entre HIE et la survenue de syndrome thoracique aigu souligne l'intérêt de mesurer la SpO₂ lors d'un exercice chez les enfants drépanocytaires. D'autre part, il est à noter que dans l'étude de Lamarre et collaborateurs, réalisée chez la même population au sein de notre équipe, nous avons trouvé une association entre le seuil de désagrégation érythrocytaire et les antécédents de syndrome thoracique aigu (220). Ces résultats montrent une association étroite entre le seuil de désagrégation érythrocytaire, l'HIE et les antécédents de syndrome thoracique aigu.

268

Hematological and hemorheological determinants of steady-state and exercise-induced hypoxemia in patients with sickle cell disease

Xavier Waltz^{a,b}, Marie-Laure Lalanne-Mistrih^{a,c}, Marc Romana^a, Roberto F Machado^d, Yann Lamarre^a; Vanessa Tarer^e, Benoît Tressières^c, Lydia Diavialle-Doumdo^f, Marie Petras^f, Frederic Maillard^g, Marie-Dominique Hardy-Dessources^a, Maryse Etienne-Julan^{e,f}, Philippe Connes^{a,b}.

^aUMR Inserm 665, Pointe-à-Pitre, F-97159 Guadeloupe, Université des Antilles et de la Guyane, Pointe-à-Pitre, F-97157, France ; ^bLaboratoire ACTES (EA 3596), Département de Physiologie, Université des Antilles et de la Guyane, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France ; ^cCIC-EC 802 Inserm, Centre Hospitalier Universitaire de Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, France; ^dSection of Pulmonary, Critical Care Medicine, Sleep and Allergy, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL 60612, USA ; ^eCentre de référence maladies rares pour la drépanocytose aux Antilles-Guyane, Centre Hospitalier et Universitaire de Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, France ; ^fUnité Transversale de la Drépanocytose, Centre Hospitalier et Universitaire de Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, France ; ^gService de Pédiatrie du Centre Hospitalier et Universitaire de Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, F-97159 Guadeloupe

Running title: Hypoxemia and blood rheology

Corresponding author:

Philippe Connes, PhD:

Inserm U665, CHU de Pointe-à-Pitre, 97159, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe France;

Email: pconnes@yahoo.fr;

Tel: (+590) 590 83 48 99; Fax: (+590) 590 83 05 13.

Abstract word count: 246 ; Text word count: 3801; Figure/Table count: 0 figure and 4 tables; Reference count: 46

Abstract

Background: It remains unknown whether blood rheological abnormalities in sickle cell disease (SCD) could be involved in steady-state or exercise-induced hypoxemia (EIH). Design and methods: One-hundred seven SCD children (50 SC and 57 SS) performed a 6minute-walk test (6MWT) with hemoglobin oxygen saturation (SpO₂) being measured before and after the effort. Hematological and hemorheological parameters, rates of vaso-occlusive episodes and acute chest syndrome, were determined for all children. At steady-state, SCD children were classified into three groups: no desaturation ($SpO_2 > 98\%$), mild desaturation $(95 \le \text{SpO}_2 \le 98\%)$ or moderate desaturation $(\text{SpO}_2 < 95\%)$.¹ EIH was defined as a drop of $SpO_2 \ge 3\%$ at the end of the 6MWT compared to the steady-state level. *Results:* No SC children but ~50% of SS children exhibited mild or moderate hemoglobin oxygen desaturation at steady-state which was independently associated with the level of hemolysis. EIH was observed in 18% of SC children and 34% of SS children, and was independently associated with the 6-minutes walked performance, ACS rate and the level of RBC disaggregation threshold in SS children. No predictor of EIH was observed in SC children. Conclusions Steady-state hypoxemia is common in SS children but not in SC children, and is mainly associated to a greater hemolytic rate. EIH may occur more frequently in SS than in SC children. The physiological strain, the red blood cell aggregation properties and the frequency of acute chest syndrome may predict the occurrence of EIH in SS children.

Key words: Sickle cell disease, hypoxemia, exercise, blood rheology, hemolysis

Introduction

Steady-state hypoxemia¹⁻⁷ and exercise-induced hypoxemia (EIH)^{1, 7} are common in sickle cell disease (SCD). Steady-state hypoxemia in SCD is associated with an increased risk for vaso-occlusive crises,⁸ stroke⁹ and pulmonary hypertension.^{1, 7} The cellular activation and abnormal vascular cell adhesion mechanisms caused by steady-state hypoxemia could be involved in the occurrence of these complications.¹⁰ In addition, EIH during a six-minutes walking test has been recently demonstrated to be associated with a higher tricuspid regurgitation velocity in SCD children.¹

Intrinsic lung disease or pulmonary dysfunction have been suggested to participate to the steady-state hypoxemia or EIH, but several studies failed to demonstrate an association.^{1, 3, 10} Hypoxemia may be partially explained by a rightward shift of the oxyhaemoglobin dissociation curve because of the decreased affinity of sickle hemoglobin¹¹ caused by an increased content of erythrocyte 2,3- bisphosphoglycerate.¹² A growing evidence also suggests that steady-state hypoxemia and EIH are independently associated with anemia ^{2, 6, 10, 13} and hemolysis.^{1, 2, 6, 10, 13, 14} It is proposed that the chronic hemolysis could alter pulmonary vasculature by promoting pulmonary vasculopathy that could cause ventilation-perfusion mismatching and limit the acquisition of oxygen by hemoglobin.¹⁵

SCD is characterized by severe hemorheological abnormalities, which play a role in the pathophysiology of several acute and chronic complications.¹⁵⁻²² Experimental works in non-SCD subjects and mathematical modeling strongly suggest that hemorheological impairment may participate to steady-state hypoxemia.²³ Hematocrit and red blood cell (RBC) deformability have been demonstrated to modulate pulmonary diffusing capacity.^{23, 24} In

healthy subjects without SCD, blood rheology is suspected to participate to EIH with hypoxemic sportsmen having more rigid RBCs than sportsmen without a reduction of hemoglobin oxygen saturation during exercise.^{25, 26} The same observation has been done in exercising horses with hypoxemic horses having decreased RBC deformability and increased RBC aggregation.^{25, 27} These RBC rheological abnormalities may affect the recruitment of pulmonary capillaries, hence increasing ventilation-perfusion mismatching, leading to a reduction of oxygen saturation.^{25, 28} However, the associations between hemorheological abnormalities and steady-state hypoxemia or EIH have never been studied in the context of SCD.

The aim of the present study was to test these associations in the SCD children included in the SAPOTILLE project.²¹ The exercise used in this study was the 6-minute walk test, which is well adapted for this population and reflects a certain degree of clinical severity.^{1, 29, 30} Previous studies showed that hypoxemia is less frequent in sickle-hemoglobin C disease (SC) than in homozygous sickle cell anemia (SS) ^{2, 6, 10, 13, 31} and that SC and SS disease should be considered as distinct pathology.³² The hemorheological profile of SC patients considerably differs from the one of SS patients.¹⁹ For these reasons, SC and SS children were analyzed separately.

Material and methods

Patients

The study took place between January 2010 and January 2011, and included 107 children with SCD (50=SC; 57=SS) between the ages of 8 and 16 years old. This patient group represents 92% of the SCD pediatric cohort in this age range, followed since birth by the Sickle Cell

Center at the Academic Hospital of Pointe-à-Pitre (Guadeloupe, French West Indies). All children had been identified by neonatal screening, and diagnosis was made as previously described.³³ Polymerase Chain Reaction (Gap-PCR) was used to detect 6 common α -thalassemia deletions, including $-\alpha^{3.7}$ and $-\alpha^{4.2}$ alleles and triplication defects of the α -globin genes.^{34, 35}

Steady-state was defined as no blood transfusions in the previous three months and absence of acute episodes (infection, vaso-occlusive crises (VOC), acute chest syndrome (ACS), stroke, priapism, splenic sequestration) at least one month before inclusion into the study.

The hemorheological and hematological parameters were measured in blood, sampled at steady-state. Charts were retrospectively reviewed by three physicians to identify all ACS and VOC episodes from birth to the time of blood sampling. Criteria to define VOC and ACS were those from the study of Lamarre *et al.*²¹ The rates of ACS and VOC were calculated for each child by dividing the total number of ACS or painful VOC episodes by the number of patient-years.^{21, 36} After blood sampling, each patient performed a 6-minute walk test (6MWT). 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/Ouest Outre Mer III, Bordeaux, France, registration number: 2009-A00211-56). All children and their parents were informed about the purpose and procedures of the study, and gave their written consent.

Six-minute walk Test (6MWT)

An unencouraged self-paced 6MWT was conducted according to the guidelines of the American Thoracic Society.³⁷ The 6MWT is not correlated with maximal exercise capacity in SCD children and young adults,³⁸ but reflects the functional exercise level for daily physical

activities since most activities of daily living are performed at submaximal levels of exertion.³⁷

The distance walked was recorded after 6 minutes for all patients. Transcutaneous pulse oximetry hemoglobin oxygen saturation (SpO₂) (SureSigns VS3 No. 3000, Philips Medical System, Andover, MA, USA) was obtained before and immediately after the 6MWT. The percentage of predicted distance was calculated according to the models of Geiger obtained in healthy children.³⁹ To define hemoglobin oxygen desaturation (*i.e.*, hypoxemia) at steady-state and exercise in SCD children we used the criteria used by Campbell *et al.*¹ At steady-state, SCD children were classified into three groups: no desaturation (SpO₂ > 98%), mild desaturation (95 \leq SpO₂ \leq 98%) and moderate desaturation (SpO₂ < 95%).¹ EIH was defined as a drop of SpO₂ of 3% or more during exercise compared to the steady-state level.¹

Hematological and hemorheological measurements

Venipuncture was performed in EDTA tubes between 8:00 a.m. and 10:00 a.m. and blood samples were immediately used for measurements of hemoglobin concentration, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, reticulocytes, RBCs, platelets and leukocytes count (Max M-Retic, Coulter, USA). Hematocrit was measured after blood microcentrifugation at 9500g (JOUAN-HEMA-C, Saint Herblain, France). Serum lactate dehydrogenase and total bilirubin concentrations were determined by standard biochemistry methods. Percent of reticulocytes, as well as, serum concentrations of lactate dehydrogenase and total bilirubin reflect the hemolytic rate of the SCD patients.¹

Hemorheological parameters were measured immediately after sampling and after full reoxygenation of blood for 10-15 min as recommended.⁴⁰ We strictly followed the guidelines for international standardization in blood rheology techniques/measurements.⁴⁰ Blood viscosity was measured at native hematocrit and at room temperature ($\approx 25^{\circ}$ C) using a coneplate viscometer (Brookfield DVII+ with CPE40 spindle) at 90 s⁻¹. RBC deformability was determined at two shear stresses (3 and 30 Pa) by laser diffraction analysis (ecktacytometry) and at 37°C, using the Laser assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA, RR Mechatronics, Hoorn, The Netherlands). The system calculates an average RBC elongation index. The higher this index, the more deformable the RBCs. RBC aggregation was determined at 37°C via syllectometry (*i.e.*, laser backscatter versus time), using the LORCA (RR Mechtronics, Hoom, The Netherlands), after adjustment of hematocrit to 40%. The system calculates an aggregation index. The disaggregation threshold – *i.e.*, the minimal shear rate needed to prevent RBC aggregation or to break down existing RBC aggregates – was determined using a re-iteration procedure.⁴¹ Note that RBC disaggregation threshold mainly reflects the RBC aggregate strength while RBC aggregation index is a measure of the extent of aggregation integrated during a time period of 2 minutes.

Statistics

All values were expressed as means \pm SD. The data were tested for the normality (Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity of variance (Levene test). ANOVA (and Tukey post-hoc test) or unpaired Student's t-test were used to compare the different parameters. When the rules for parametric test application were not fulfilled, a Kruskall-Wallis test (and Dunn's multiple comparison test) or a Mann-Whitney test were used. A Chi-square test was used to test the influence of sex, α -thalassemia or hydroxyurea treatment on the hemoglobin oxygen desaturation at rest or induced by exercise.

To identify the independent predictors of steady-state hemoglobin oxygen desaturation in SS children (Table 2), we used an ordinal multivariate logistic model with baseline SpO_2 being

used to define three ordered categories (no desaturation: $SpO_2 > 98$, mild desaturation: $95 \le SpO_2 \le 98$, moderate desaturation: $SpO_2 < 95$). Because no SC children had desaturation at rest, we were not able to perform the same analysis in this subpopulation.

To identify factors independently associated with exercise-induced hemoglobin oxygen desaturation in SC and SS children, we used a binary (*i.e.*, no desaturation = decrease of SpO₂ < 3, or exercise-induced hemoglobin desaturation = decrease of SpO₂ \geq 3) multivariate logistic model. All variables at p < 0.2 by univariate analyses were included as covariates in the multivariate model. Significance level was defined as p < 0.05. Analyses were conducted using SPSS (v. 20, IBM SPSS Stratistics, Chicago, IL).

Results

Comparisons between SS and SC children

The data are reported in the Table 1. Gender distribution, prevalence of α -thalassemia, age and systolic pressure at rest were similar between the SC and SS groups. Diastolic pressure was significantly lower in the SS group compared to the SC group. While 21.1% of the SS children were under hydroxyurea therapy (12/57 patients), none of the SC group received HU.

SS children exhibited lower SpO₂ at rest and after the 6MWT (p < 0.001), higher exerciseinduced hemoglobin oxygen desaturation (p < 0.01) and reduced 6-min walked distance (p < 0.05) compared to SC children. No SC children but ~50% of SS children had hemoglobin oxygen desaturation at steady-state (*i.e.*, SpO₂ < 99). Immediately after the 6MWT, ~18% of SC children and ~34% of SS children exhibited hemoglobin oxygen desaturation compared to steady-state SpO₂ (*i.e.*, a drop of SpO₂ \geq 3%). The percentage of predicted walked distance tended to be lower in SS children compared to SC children (p = 0.088). None of the SCD children included in this study had to prematurely stop the 6MWT and no unexpected events occurred during the tests.

As expected, foetal hemoglobin level, leukocytes and platelets count, mean cell volume, mean cell hemoglobin, percentage of reticulocytes, lactate dehydrogenase and total bilirubin were significantly higher (p < 0.001) in SS than in SC children while RBCs count, hemoglobin and hematocrit levels were significantly lower (p < 0.001) in SS than in SC children.

As previously reported in this pediatric cohort,²¹ blood viscosity and RBC deformability at 30 Pa were significantly lower in SS than in SC children (p < 0.001) while RBC deformability at 3 Pa and the RBC disaggregation threshold were not significantly different between the two groups. SS children had a higher RBC aggregation index than SC children (p < 0.01). The SS children exhibited greater VOC (p < 0.05) and ACS rates (p < 0.001) than SC children.

Steady-state hemoglobin oxygen desaturation in SS children.

While no SC children had hemoglobin oxygen desaturation at rest, 19 SS children had mild SpO_2 desaturation (95 \leq SpO₂ \leq 98 %) and 8 had moderate oxygen desaturation at rest (SpO₂ < 95%) (Table 2). Distribution for gender and α -thalassemia, age and the 6MWT parameters did not differ between the three SS subgroups. The frequency of patients under hydroxyurea therapy was not different but had a p < 0.20 by ANOVA.

RBCs count (p < 0.05) was lower in the moderate group compared to the subgroup without SpO_2 desaturation. Hemoglobin and hematocrit levels were lower in mild (p < 0.05) and moderate desaturation groups (p < 0.05 and p < 0.001, respectively) compared to patients with no desaturation. The levels of reticulocytes (p < 0.001), lactate dehydrogenase (p<0.05) and total bilirubin (p < 0.05) were higher in the moderate desaturation group compared to the two

other groups. No difference was detected between the three groups for foetal hemoglobin, leukocytes, platelets, mean cell volume and mean cell hemoglobin levels.

The hemorheological parameters were not different between the three groups, except for RBC deformability, which was lower in mild (p < 0.01) and moderate desaturation (p < 0.001) groups compared to patients with no desaturation. RBC deformability was also lower in the moderate desaturation group compared to the mild desaturation subgroup (p < 0.05 and p = 0.054 at 3 and 30 Pa, respectively). The RBC disaggregation threshold, RBC aggregation index and VOC rates were not different between the three groups but had a p < 0.20 by ANOVA. ACS rates did not differ between the three groups.

An ordinal multivariate logistic model was used to test the parameters independently associated with steady-state hemoglobin oxygen desaturation in SS children and included hydroxyurea treatment as factor and hemoglobin, percentage of reticulocytes, RBC deformability at 30 Pa, RBC aggregation index, RBC disaggregation threshold, and VOC rate as covariates. RBCs count, hematocrit, lactate dehydrogenase, total bilirubin and RBC deformability at 3 Pa were not included in the model to avoid co-linearity effects with hemoglobin level, percentage of reticulocytes or RBC deformability at 30 Pa. The overall model was highly significant (Chi-square = 36.92; df = 7; p < 0.001). However, only the percentage of reticulocytes was significantly associated with the steady-state hemoglobin oxygenation desaturation groups with an odd ratio of 1.19 (95% CI 1.03 to 1.38, p < 0.05).

Exercise-induced hemoglobin oxygen desaturation in SS and SC children.

The results concerning the comparisons between patients without exercise-induced SpO_2 desaturation and patients with exercise-induced SpO_2 desaturation are reported in the Tables 3 and 4 for SC and SS children, respectively.

In SC children (table 3), no difference was observed between the two subgroups, except for the VOC rate, which was greater in the children exhibiting exercise-induced SpO₂ reduction (p < 0.05). The RBC disaggregation threshold showed no difference between the two subgroups but had a p < 0.20 by Mann-Whitney test. A binary multivariate logistic model was used that included VOC rate and the RBC disaggregation threshold as covariates. The overall model was not statistically significant (chi-square = 2.121; df = 2; p = 0.346).

For the SS group (table 4), we observed a difference between children with and without exercise-induced hemoglobin desaturation for gender distribution (p < 0.05), walked distance (p = 0.05), percentage of predicted walked distance (p < 0.05) and ACS rate (p < 0.05). The RBC disaggregation threshold showed no difference between the two subgroups but had a p < 0.20 by Mann-Whitney test. The other parameters did not differ between the two subgroups. A binary multivariate logistic model was used to predict the hemoglobin oxygen desaturation in SS children and included sex ratio as factor and percentage of predicted distance, RBC disaggregation threshold and ACS rate as covariates. The distance walked was not included in the model to avoid co-linearity effects with the percentage of predicted walked distance. The overall model was highly significant (chi-square = 20.885; df = 4; p < 0.001). The percentage of predicted distance (odd ratio: 1.13; 95% CI 1.03 to 1.21; p < 0.01), the RBC disaggregation threshold (odd ratio: 1.01; 95% CI 1.002 to 1.019; p < 0.05) and ACS rate (odd ratio: 1.05;

95% CI 1.008 to 1.101; p < 0.05) were significantly associated with exercise hemoglobin oxygen desaturation.

Discussion

The present study showed that 1) no SC children had steady-state hypoxemia, whereas ~50% of SS children had steady-state hypoxemia; 2) steady-state hypoxemia in SS children was independently associated with the level of hemolysis; 3) EIH was observed in 18% of SC children and 34% of SS children; 4) EIH was independently associated in SS children with the 6-minutes walked performance, ACS rate and the level of the RBC disaggregation threshold; 5) no predictor of EIH was observed in SC children.

The present study did not use arterial blood gases to confirm the reduction of arterial oxygen partial pressure and hemoglobin oxygen saturation in SCD children. This could be considered as a limit because some authors suggested that pulse oximetry overestimates arterial oxygen saturation in SCD.^{42, 43} However, pulse oximetry seems to be a more reliable technique for the measurement of the hypoxemic status than arterial blood gases analysis in SCD.^{4, 5} Although pulse oximetry does not measure dysfunctional hemoglobin (*i.e.*, methemoglobin or carboxyhemoglobin) and, thus overestimates the true arterial oxygen saturation, it correlates well with co-oximetry (*i.e.*, the gold standard method) in SCD.^{4, 5} Moreover, the use of pulse oximetry to detect the hemoglobin oxygen saturation has been proven very useful to predict the risks for stroke or pulmonary hypertension in this population.^{1, 7, 9}

Whereas none of the SC children included in our study had steady-state hypoxemia, almost 50% of the SS children had resting hemoglobin oxygen desaturation. Intrinsic lung disease or

pulmonary dysfunction have been suggested to participate to the steady-state hypoxemia. However several studies failed to demonstrate an association.^{1, 3, 10} and we found no difference between the three subgroups (*i.e.*, normal, mild and moderate desaturation groups) for forced expiratory volume in 1 second (FEV), forced vital capacity (FVC) and FEV/FVC (data not shown). In addition, the frequencies of obstructive, restrictive or mixed respiratory syndromes were not different between the subgroups (data not shown). The independent association found between the percentage of reticulocyte and steady-state hypoxemia in SS children is in accordance with several previous studies showing that the hemolytic rate is a predictor of steady-state hemoglobin oxygen desaturation in this population.^{1, 2, 6, 10, 13, 14} Kato *et al.* and Campbell *et al.* proposed that the chronic hemolysis could be responsible for pulmonary vasculopathy, which may disturb gas exchanges between the lungs and the blood circulation causing ventilation-perfusion mismatching and steady-state hypoxemia.^{1, 15}

In agreement with the greater hemolytic rate in SS patients with steady-state hypoxemia, several studies described an independent association between the level of anemia and hemoglobin oxygen desaturation.^{2, 6, 10, 13} We also found a lower hemoglobin level in SS children with hypoxemia compared to SS children without hypoxemia but the ordinal multivariate logistic model failed to demonstrate an independent association between the two parameters. The reasons of this lack of independent association are unknown but Quinn *et al* (2005) observed that the level of anemia explained only 5% of the variability of arterial oxygen desaturation in SS/S β^0 thalassemia children and suggested that anemia was not the main factor explaining the presence of steady-state hypoxemia.⁶

Lionnet *et al* (2012) recently demonstrated that SC disease should not be considered as a mild form of SS disease but as a genuine disease.³² SS and SC patients have very different

hematological and hemorheological characteristics,¹⁹ as confirmed in the present study. We are the first to investigate the factors associated with EIH in SC and SS children, separately. The prevalence of EIH during a 6MWT was twofold higher in SS children compared to SC children, emphasizing the greater risk for exercise-related complications in the former population since transient hypoxemic/hypoxic episodes could impair the rheology of RBCs and activate endothelial cells. Nevertheless, a small proportion of SC children (almost 20%) may experience exercise-induced hemoglobin oxygen desaturation. Accurate screening of pulse oxymetry during cardiopulmonary testing should be done in SC patients to identify those who could be at greater risk for exercise-related complications. However, we found no association between the parameters investigated and EIH in the SC group, and the mechanisms of the reduction of hemoglobin oxygen saturation during exercise in this population remain unknown at that time. However, since the hemolytic rate is considerably lower in SC children than in SS children, SC patients could be protected against hypoxemia.

As for hemoglobin oxygen desaturation at rest (see above), EIH in SS children was not related to lung dysfunction (data not shown). The independent association between EIH and the high percentage of predicted distance in SS children suggests that the magnitude of the physiological strain during the 6MWT plays a role in the occurrence of hypoxemia. The same picture has been reported in healthy sportsmen with the occurrence of transient EIH being dependent on the intensity at which the athletes are exercising.⁴⁴ At such exercise intensity, some athletes exceed the limits of their cardiovascular system to reach the limits of their pulmonary system that causes hypoxemia.⁴⁴ In this non-SCD context, blood rheological alterations have been suspected to participate to the occurrence of EIH.^{25, 26} The independent association reported between the elevated RBC disaggregation threshold and EIH in SS

children in the present study also supports a role of blood rheology in this manifestation. High RBC disaggregation threshold means that the strength of RBC aggregates is elevated.¹⁹ This may increase flow resistance and disturb microcirculation at the entry of the pulmonary capillaries where RBCs aggregates need to be fully dispersed before they can be able of entering into, and negotiate small capillaries to promote adequate gas exchanges between the lungs and RBCs.⁴⁵ The independent association between ACS rate and exercise-induced hemoglobin oxygen desaturation is also a major finding. The occurrence and repetition of ACS episodes in SS children could alter the pulmonary vasculature. The resulting ventilation-perfusion mismatching⁴⁶ could then predispose SS patients to exhibit hypoxemic episodes during exercise. Amazingly, Lamarre *et al* (2012) recently reported, in this SS pediatric cohort, that increased RBC disaggregation threshold, notably in boys, could increase the risks for ACS.²¹ Indeed, a link between increased RBC disaggregation threshold, increased ACS rates and exercise-induced hemoglobin oxygen desaturation oxygen desaturation could be suspected.

In conclusion, we found that steady-state hypoxemia is common in SS children but not in SC children, and is mainly associated with a greater hemolytic rate. EIH may occur in both SC and SS children, but more frequently in the later population. The physiological strain, the RBC aggregation properties and the occurrence and repetition of ACS are probably involved in the occurrence of exercise-induced hypoxemia in SS children.

Acknowledgments

This work has been supported by a Projet Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) Interregional. PhD funding of X.W. was supported by the association by the regional council of Guadeloupe. We thank all the patients who participated in the present study.

Authorship and disclosures

Contribution: X.W., M.L.L.M, M.R., Y.L., B.T., M.D.H.D., F.M., V.T., M.E.J. and P.C. designed the research; X.W., M.R., Y.L., V.T., B.T., L.D.D., M.P., F.M. and P.C. performed experiments; X.W., B.T. and P.C. analyzed results and made the figures; X.W. and P.C. interpreted data; X.W., M.L.L.M, M.R., R.F.M., Y.L., V.T., B.T., L.D.D., M.P., F.M., M.D.H.D., M.E.J. and P.C. wrote and comments the paper.

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1. Campbell A, Minniti CP, Nouraie M, Arteta M, Rana S, Onyekwere O, et al. Prospective evaluation of haemoglobin oxygen saturation at rest and after exercise in paediatric sickle cell disease patients. Br J Haematol. 2009 Nov;147(3):352-9.
- 2. Rackoff WR, Kunkel N, Silber JH, Asakura T, Ohene-Frempong K. Pulse oximetry and factors associated with hemoglobin oxygen desaturation in children with sickle cell disease. Blood. 1993 Jun 15;81(12):3422-7.
- 3. Needleman JP, Franco ME, Varlotta L, Reber-Brodecki D, Bauer N, Dampier C, et al. Mechanisms of nocturnal oxyhemoglobin desaturation in children and adolescents with sickle cell disease. Pediatr Pulmonol. 1999 Dec;28(6):418-22.
- 4. Needleman JP, Setty BN, Varlotta L, Dampier C, Allen JL. Measurement of hemoglobin saturation by oxygen in children and adolescents with sickle cell disease. Pediatr Pulmonol. 1999 Dec;28(6):423-8.
- 5. Fitzgerald RK, Johnson A. Pulse oximetry in sickle cell anemia. Crit Care Med. 2001 Sep;29(9):1803-6.
- 6. Quinn CT, Ahmad N. Clinical correlates of steady-state oxyhaemoglobin desaturation in children who have sickle cell disease. Br J Haematol. 2005 Oct;131(1):129-34.
- 7. Minniti CP, Sable C, Campbell A, Rana S, Ensing G, Dham N, et al. Elevated tricuspid regurgitant jet velocity in children and adolescents with sickle cell disease: association with hemolysis and hemoglobin oxygen desaturation. Haematologica. 2009 Mar;94(3):340-7.
- 8. Hargrave DR, Wade A, Evans JP, Hewes DK, Kirkham FJ. Nocturnal oxygen saturation and painful sickle cell crises in children. Blood. 2003 Feb 1;101(3):846-8.
- 9. Quinn CT, Sargent JW. Daytime steady-state haemoglobin desaturation is a risk factor for overt stroke in children with sickle cell anaemia. Br J Haematol. 2008 Feb;140(3):336-9.
- 10. Setty BN, Stuart MJ, Dampier C, Brodecki D, Allen JL. Hypoxaemia in sickle cell disease: biomarker modulation and relevance to pathophysiology. Lancet. 2003 Nov 1;362(9394):1450-5.
- 11. 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.
- 12. Milner PF. Oxygen transport in sickle cell anemia. Arch Intern Med. 1974 Apr;133(4):565-72.
- 13. Homi J, Levee L, Higgs D, Thomas P, Serjeant G. Pulse oximetry in a cohort study of sickle cell disease. Clin Lab Haematol. 1997 Mar;19(1):17-22.
- 14. Kato GJ, McGowan V, Machado RF, Little JA, Taylor Jt, Morris CR, et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. Blood. 2006 Mar 15;107(6):2279-85.
- 15. 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.
- 16. Chien S, Usami S, Bertles JF. Abnormal rheology of oxygenated blood in sickle cell anemia. J Clin Invest. 1970 Apr;49(4):623-34.
- 17. 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.
- 18. Kaul DK, Fabry ME. In vivo studies of sickle red blood cells. Microcirculation. 2004 Mar;11(2):153-65.
- 19. Tripette J, Alexy T, Hardy-Dessources MD, Mougenel 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.

- 20. Waltz X, Hedreville M, Sinnapah S, Lamarre Y, Soter V, Lemonne N, et al. Delayed beneficial effect of acute exercise on red blood cell aggregate strength in patients with sickle cell anemia. Clin Hemorheol Microcirc. 2012.
- 21. 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 sickle cell disease. Haematologia. 2012.
- 22. Waltz X, Pichon A, Mougenel D, Lemonne N, Lalanne-Mistrih ML, Sinnapah S, et al. Hemorheological alterations, decreased cerebral microvascular oxygenation and cerebral vasomotion compensation in sickle cell patients. Am J Hematol. In press Aug 2.
- 23. Hsia CCW. Pulmonary diffusion, Ventilation-Perfusion Ratio and Arterial Oxygen Homeostasis. In: Connes P, Hue O, Perrey S, eds. Exercise Physiology: from a Cellular to an Integrative Approach. Amsterdam, Berlin, Tokyo, Washington DC: IOS Press, 2010:95-116.
- 24. Hsia CC, Johnson RL, Jr., Shah D. Red cell distribution and the recruitment of pulmonary diffusing capacity. J Appl Physiol. 1999 May;86(5):1460-7.
- 25. Caillaud C, Connes P, Bouix D, Mercier J. Does haemorheology explain the paradox of hypoxemia during exercise in elite athletes or thoroughbred horses? Clin Hemorheol Microcirc. 2002;26(3):175-81.
- 26. Connes P, Bouix D, Durand F, Kippelen P, Mercier J, Prefaut C, et al. Is hemoglobin desaturation related to blood viscosity in athletes during exercise? Int J Sports Med. 2004 Nov;25(8):569-74.
- 27. Boucher JH, Ferguson EW, Wilhelmsen CL, Statham N, McMeekin RR. Erythrocyte alterations endurance exercise in horses. J Appl Physiol. 1981 Jul;51(1):131-4.
- 28. Boucher JH, Connes P. Hemorheopathy in exercising horses. Clin Hemorheol Microcirc. 2008;40(1):73-5.
- 29. Anthi A, Machado RF, Jison ML, Taveira-Dasilva AM, Rubin LJ, Hunter L, et al. Hemodynamic and functional assessment of patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. Am J Respir Crit Care Med. 2007 Jun 15;175(12):1272-9.
- 30. Connes P, Machado R, Hue O, Reid H. Exercise limitation, exercise testing and exercise recommendations in sickle cell anemia. Clin Hemorheol Microcirc. 2011;49(1-4):151-63.
- 31. Rampling MW. Compositional Properties of Blood. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ, eds. Handbood of hemorheology and hemodynamics. Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington DC: IOS Press, 2007:34-44.
- 32. Lionnet F, Hammoudi N, Stojanovic KS, Avellino V, Grateau G, Girot R, et al. Hemoglobin sickle cell disease complications: a clinical study of 179 cases. Haematologica. 2012 Aug;97(8):1136-41.
- 33. Tarer V, Etienne-Julan M, Diara JP, Belloy MS, Mukizi-Mukaza M, Elion J, et al. Sickle cell anemia in Guadeloupean children: pattern and prevalence of acute clinical events. Eur J Haematol. 2006 Mar;76(3):193-9.
- 34. Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. Blood. 2001 Jul 1;98(1):250-1.
- 35. Wang W, Ma ES, Chan AY, Prior J, Erber WN, Chan LC, et al. Single-tube multiplex-PCR screen
- for anti-3.7 and anti-4.2 alpha-globin gene triplications. Clin Chem. 2003 Oct;49(10):1679-82.
- 36. 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.
- 37. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. Am J Respir Crit Care Med. 2002 Jul 1;166(1):111-7.
- Liem RI, Nevin MA, Prestridge A, Young LT, Thompson AA. Functional capacity in children and young adults with sickle cell disease undergoing evaluation for cardiopulmonary disease. Am J Hematol. 2009 Oct;84(10):645-9.

- 39. Geiger R, Strasak A, Treml B, Gasser K, Kleinsasser A, Fischer V, et al. Six-minute walk test in children and adolescents. J Pediatr. 2007 Apr;150(4):395-9, 9 e1-2.
- 40. 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.
- 41. Hardeman MR, Dobbe JG, Ince C. The Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer. Clin Hemorheol Microcirc. 2001;25(1):1-11.
- 42. Comber JT, Lopez BL. Evaluation of pulse oximetry in sickle cell anemia patients presenting to the emergency department in acute vasoocclusive crisis. Am J Emerg Med. 1996 Jan;14(1):16-8.
- 43. Callahan LA, Woods KF, Mensah GA, Ramsey LT, Barbeau P, Gutin B. Cardiopulmonary responses to exercise in women with sickle cell anemia. Am J Respir Crit Care Med. 2002 May 1;165(9):1309-16.
- 44. Prefaut C, Durand F, Mucci P, Caillaud C. Exercise-induced arterial hypoxaemia in athletes: a review. Sports Med. 2000 Jul;30(1):47-61.
- 45. 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.
- 46. Sullivan KJ, Goodwin SR, Evangelist J, Moore RD, Mehta P. Nitric oxide successfully used to treat acute chest syndrome of sickle cell disease in a young adolescent. Crit Care Med. 1999 Nov;27(11):2563-8.

	SC (n=50)	SS (n=57)
Age (yrs)	12.0 ± 2.3	11.5 ± 2.3
Systolic pressure (mmHg)	106 ± 9	106 ± 9
Diastolic pressure (mmHg)	69 ± 9	$63 \pm 8^{**}$
Sex ratio (M/F)	29/21	28/29
α-thalassemia (%)	34.0	39.3
Hydroxyurea (%)	0	21.1
SpO ₂ at rest (%)	99.8 ± 0.4	$97.6 \pm 2.9 * * *$
SpO ₂ post-exercise (%)	98.8 ± 3.0	95.1 ± 5.2***
Δ SpO ₂ pre/post exercise (%)	-1 ± 3.1	$-2.5 \pm 3.8 * *$
Walked distance (m)	494 ± 89	$459 \pm 76*$
Percentage of predicted distance (%)	74.1 ± 12.3	70.0 ± 11.4
Foetal hemoglobin (%)	2.8 ± 2.8	8.5 ± 6.4 ***
Leukocytes (10 ⁹ .dL ⁻¹)	7.3 ± 2.8	$11.1 \pm 2.8 * * *$
Red blood cells (10 ¹² .dL ⁻¹)	4.4 ± 0.5	2.9 ± 0.6 ***
Platelets (10 ⁹ .dL ⁻¹)	281 ± 133	458 ± 124 ***
Hemoglobin (g.dL ⁻¹)	11.2 ± 1.0	7.8 ± 1.2 ***
Hematocrit (%)	33.2 ± 2.8	$24.6 \pm 4.2 * * *$
Mean cell volume (fl)	71.8 ± 5.8	81.6 ± 8.5***
MCH (pg)	25.4 ± 2.4	28.0 ± 3.2 ***
Reticulocytes (%)	3.0 ± 1.1	10.8 ± 5.4 ***
Lactate dehydrogenase (IU)	301 ± 81	551 ± 188 ***
Total bilirubin (µmol.L ⁻¹)	22.0 ± 10.0	$60.8 \pm 41.4 ***$
Blood viscosity (mPa.s ⁻¹)	8.4 ± 2.0	6.9 ± 2.3 ***
RBC deformability at 3 Pa (a.u)	0.17 ± 0.03	0.16 ± 0.06
RBC deformability at 30 Pa (a.u)	0.45 ± 0.05	0.39 ± 0.11 ***
RBC aggregation index (%)	44.6 ± 8.4	50.1 ± 10.4 **
RBC disaggregation threshold (s ⁻¹)	282 ± 120	267 ± 100
VOC rate	0.25 ± 0.39	$0.54 \pm 1.01*$
ACS rate	0.03 ± 0.06	0.14 ± 0.17 ***

Table 1. Subjects' characteristics, hematological, hemorheological, VOC, ACS and 6 minutes-walk test (6MWT) parameters

Values represent mean \pm SD. MCH, mean cell hemoglobin; VOC rate, rate of vaso-occlusive crises; ACS rate, rate of acute chest syndrome; SpO₂, arterial hemoglobin oxygen saturation; Δ SpO₂ pre/post exercise, variation of SpO2 before/after the 6 minute walk test. Different from SC group (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).
Table 2. Comparison of hematological, hemorheological, ACS rate, VOC rate and 6MWT parameters of SS children classified accordingly to their level of hemoglobin oxygen saturation.

	SpO ₂ > 98%	$95 \leq SpO_2 \leq 98\%$	SpO2 < 95%
	(n=29)	(n=19)	(n=8)
Sex ratio (M/F)	13/16	10/9	5/3
α-thalassemia (%)	25.5	10.9	3.6
Hydroxyurea (%) §	16.1	3.6	1.8
Age (yrs)	11.8 ± 2.5	11.4 ± 2.2	10.4 ± 2.2
Walked distance (m)	471 ± 79	445 ± 72	450 ± 75
Percentage of predicted	71.3 ± 11.3	68.1 ± 11.9	70.0 ± 11.4
distance (%)			
Foetal hemoglobin (%)	9.2 ± 7.7	7.9 ± 4.2	4.8 ± 0.5
Leukocytes (10 ⁹ .dL ⁻¹)	10.8 ± 3.1	11.8 ± 2.7	11.2 ± 1.8
Red blood cells (10 ¹² .dL ⁻¹) \$	3.1 ± 0.6	2.7 ± 0.6	$2.4 \pm 0.2*$
Platelets (10 ⁹ .dL ⁻¹)	455 ± 135	464 ± 125	454 ± 102
Hemoglobin (g.dL ⁻¹) §	8.4 ± 1.1	$7.4 \pm 1.2*$	7.0 ± 0.6 *
Hematocrit (%) \$	26.5 ± 3.9	$23.4 \pm 3.6*$	20.8 ± 2.9 ***
Mean cell volume (fl)	81.9 ± 9.5	80.1 ± 8.0	83.8 ± 5.8
MCH (pg)	27.7 ± 3.7	27.7 ± 2.8	29.9 ± 2.2
Reticulocytes (%) §	8.5 ± 4.1	11.5 ± 4.6	$18.0 \pm 5.5^{***}^{\dagger}^{\dagger}$
Lactate dehydrogenase (IU) \$	476 ± 148	608 ± 125	$655 \pm 309*$
Total bilirubin (μmol.L ⁻¹) \$	43.4 ± 22.4	72.1 ± 50.7	$101.1 \pm 45.6*$
Blood viscosity (mPa.s ⁻¹)	6.9 ± 2.3	6.4 ± 1.9	8.1 ± 2.6
RBC deformability at 3 Pa	0.19 ± 0.06	$0.15 \pm 0.05*$	$0.09 \pm 0.03^{***}$ †
(a.u) \$			
RBC deformability at 30 Pa	0.44 ± 0.09	0.35 ± 0.08 **	0.26 ± 0.07 ***
(a.u) §			
RBC aggregation index (%)§	52.0 ± 10.4	49.9 ± 9.9	42.1 ± 8.2
RBC disaggregation threshold	237 ± 74	280 ± 78	347 ± 176
(s ⁻¹)§			
VOC rate §	0.82 ± 1.33	0.25 ± 0.35	0.23 ± 0.35
ACS rate	0.16 ± 0.20	0.12 ± 0.15	0.15 ± 0.15
Values represent mean \pm SD.	SpO_2 , hemoglobin	oxygen saturation;	MCH, mean cell

hemoglobin; VOC rate, rate of vaso-occlusive crises; ACS rate, rate of acute chest syndrome; Different from group with SpO₂ > 98% (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001); different from group with 95 \leq SpO₂ \leq 98% ([†]p < 0.05; ^{††}p < 0.01; ^{†††}p < 0.001). § variable with p < 0.20 include in the multivariate analysis. \$ variable discarded from the multivariate analysis to avoid colinearity. **Table 3.** Comparison of 6MWT, hematological, hemorheological, ACS rate and VOC rate parameters of SC children classified accordingly to their level of exercise-induced hemoglobin oxygen desaturation.

	SpO ₂ reduction < 3	3 SpO ₂ reduction \geq 3
	(n=40)	(n=9)
Sex ratio (M/F)	23/17	5/4
α-thalassemia (%)	28.6	4.1
Age (yrs)	12.0 ± 2.2	11.6 ± 2.6
Walked distance (m)	489 ± 88	515 ± 97
Percentage of predicted distance (%)	73.2 ± 12.5	77.8 ± 11.6
Foetal hemoglobin (%)	3.0 ± 3.1	2.4 ± 1.9
Leukocytes (10 ⁹ .dL ⁻¹)	7.3 ± 3.0	7.4 ± 2.1
Red blood cells (10 ¹² .dL ⁻¹)	4.5 ± 0.6	4.4 ± 0.5
Platelets (10 ⁹ .dL ⁻¹)	280 ± 135	291 ± 140
Hemoglobin (g.dL ⁻¹)	11.1 ± 1.1	11.4 ± 0.6
Hematocrit (%)	33.2 ± 3.0	32.9 ± 1.8
Mean cell volume (fl)	71.3 ± 6.1	73.3 ± 4.5
MCH (pg)	25.2 ± 2.5	26.2 ± 1.7
Reticulocytes (%)	2.9 ± 1.2	3.3 ± 0.9
Lactate dehydrogenase (IU)	305 ± 87	268 ± 44
Total bilirubin (µmol.L ⁻¹)	30.0 ± 9.8	23.6 ± 7.5
Blood viscosity (mPa.s ⁻¹)	8.6 ± 2.1	8.0 ± 1.5
RBC deformability at 3 Pa (a.u)	0.17 ± 0.03	0.18 ± 0.03
RBC deformability at 30 Pa (a.u)	0.45 ± 0.05	0.45 ± 0.06
RBC aggregation index (%)	44.4 ± 8.7	46.6 ± 7.2
RBC disaggregation threshold (s ⁻¹) §	274 ± 118	327 ± 122
VOC rate §	0.23 ± 0.41	$0.37 \pm 0.29*$
ACS rate	0.02 ± 0.03	0.08 ± 0.12
Values represent mean ± SD. SpO ₂ ,	hemoglobin oxygen	saturation; MCH, mean cell

hemoglobin; VOC rate, rate of vaso-occlusive crises; ACS rate, rate of acute chest syndrome; Different from group with SpO₂ reduction < 3% (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001); § variable with p < 0.20 include in the multivariate analysis. **Table 4.** Comparison of 6MWT, hematological, hemorheological, ACS rate and VOC rate parameters of SS children classified accordingly to their level of exercise-induced hemoglobin oxygen desaturation.

	SpO ₂ reduction < 3	SpO ₂ reduction \geq 3
	(n=37)	(n=19)
Sex ratio (M/F) §	15/22	13/6*
α-thalassemia (%)	27.3	12.7
Hydroxyurea (%)	16.1	5.4
Age (yrs)	11.5 ± 2.3	11.4 ± 2.5
Walked distance (m) \$	445 ± 76	$487 \pm 68 \ (p = 0.05)$
Percentage of predicted	67.7 ± 11.6	$74.4 \pm 9.8*$
distance §		
Foetal hemoglobin (%)	9.2 ± 6.9	7.3 ± 5.8
Leukocytes (10 ⁹ .dL ⁻¹)	11.3 ± 2.9	10.8 ± 2.8
Red blood cells (10 ¹² .dL ⁻¹)	2.8 ± 0.6	2.9 ± 0.6
Platelets (10 ⁹ .dL ⁻¹)	460 ± 128	453 ± 124
Hemoglobin (g.dL ⁻¹)	7.8 ± 1.3	7.9 ± 1.0
Hematocrit (%)	24.4 ± 4.3	25.1 ± 4.1
Mean cell volume (fl)	82.5 ± 8.6	79.6 ± 8.3
MCH (pg)	28.3 ± 3.1	27.5 ± 3.5
Reticulocytes (%)	10.5 ± 5.2	11.6 ± 5.9
Lactate dehydrogenase (IU)	561 ± 177	517 ± 196
Total bilirubin (µmol.L ⁻¹)	59.4 ± 41.9	63.6 ± 42.9
Blood viscosity 225 (mPa.s ⁻¹)	5.5 ± 1.4	5.2 ± 1.4
Blood viscosity 90 (mPa.s ⁻¹)	7.1 ± 2.2	6.5 ± 2.2
RBC deformability at 3 Pa (a.u)	0.17 ± 0.06	0.15 ± 0.06
RBC deformability at 30 Pa	0.39 ± 0.11	0.36 ± 0.11
(a.u)		
RBC aggregation index (%)	49.8 ± 11.1	50.0 ± 9.2
RBC disaggregation threshold	249 ± 87	302.3 ± 118
(s ⁻¹)§		
VOC rate	0.56 ± 1.19	0.51 ± 0.58
ACS rate §	0.11 ± 0.16	$0.21 \pm 0.19*$
Values represent mean \pm SD. Sp	O_2 , hemoglobin oxygen	saturation; MCH, mean cell

hemoglobin; VOC rate, rate of vaso-occlusive crises; ACS rate, rate of acute chest syndrome; Different from group with SpO₂ reduction < 3% (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001); § variable with p < 0.20 include in the multivariate analysis. \$ variable discarded from the multivariate analysis to avoid colinearity.

$X.3 \ \text{Etude} \ \text{n}^\circ 3$

Hemorheological alterations, decreased cerebral microvascular oxygenation and cerebral vasomotion compensation in sickle cell patients. *American Journal of hematology ; 2012*, 87(12): 1070-1073. IF: 4.671

X. Waltz, A. Pichon, D. Mougenel, N. Lemonne, M.L Lalanne-Mistrih, S. Sinnapah, V. Tarer,

B. Tressières, Y. Lamarre, M. Etienne-Julan, O. Hue, M.D Hardy-Dessources, P. Connes.

La saturation en oxygène de la microcirculation cérébrale (TOI, tissu oxygen index) est 20-30% inférieure chez les sujets drépanocytaires de génotype SS sans vasculopathie cérébrale (269, 326). Nous avons vu, dans la partie III.3.3, que cette réduction du TOI cérébral conduit, chez les sujets SS, à une hyperhémie fonctionnelle (voir partie IV) caractérisée par un état de vasodilatation prolongé (57) et cause ainsi l'augmentation du débit sanguin cérébral observée (171, 173). Or, cette augmentation du débit sanguin cérébral est à l'origine de retards cognitifs (364), d'une réduction de la réserve vasomotrice cérébrale (281) et de vasculopathies cérébrales (5, 42).

Concernant, les causes de la réduction du TOI cérébral, il semble que le niveau d'anémie ne soit pas impliqué dans la réduction du TOI cérébral (269, 326). Par ailleurs, il a été montré que la saturation en oxygène de la microcirculation cérébrale était augmentée après une transfusion sanguine (326) mais également après un traitement prolongé à l'hydroxyurée (368); deux traitements qui améliorent nettement la rhéologie sanguine des patients drépanocytaires.

Enfin, aucune donnée n'existe concernant les sujets SC alors que la prévalence des complications cérébrales dans cette population est 100 fois supérieure à celle d'une population contrôle (41).

Pour ces raisons, nous avons comparé le profil rhéologique, le TOI cérébral, le flowmotion et le vasomotion cérébral entre des sujets contrôle AA, des patients SC et SS sans vasculopathies (voir partie IX.2.3). L'objectif de notre étude était de tester si la réduction du TOI cérébral était associée aux altérations hémorhéologiques des patients drépanocytaires, et d'observer si le phénomène de vasomotion cérébral était augmenté chez ces patients pour compenser une éventuelle réduction du TOI cérébral. Pour le protocole voir Figure 95 ci-dessous.

293



Figure 95. Protocole de l'étude n°3. TOI = saturation oxygène au niveau de la microcirculation ("tissu oxygen index").

Nos résultats montrent que le TOI cérébral des sujets SS était réduit comparé aux sujets AA et que les sujets SC avaient un TOI cérébral intermédiaire. Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre le TOI cérébral et les altérations hématologiques/hémorhéologiques chez les sujets SC. Chez les sujets SS, la réduction du TOI cérébral était corrélée positivement avec la déformabilité érythrocytaire et positivement avec l'agrégation érythrocytaire mais pas avec le niveau d'hémoglobine ou le niveau de saturation transcutané en oxygène (SpO₂). Par ailleurs, l'activité vasomotion et flowmotion cérébral était augmentée chez les patients drépanocytaires : vasomotion/flowmotion SS > SC > AA. Le vasomotion était corrélé négativement avec le TOI cérébral chez les sujets SS uniquement (r = -0.54, p < 0.001).

Notre étude confirme la présence d'un TOI cérébral réduit chez les patients SS (269, 326, 368) et est la première à montrer que les patients SC ont un TOI cérébral intermédiaire, sans pouvoir en expliquer les raisons. Nos données suggèrent qu'une déformabilité érythrocytaire et une agrégation érythrocytaire réduite sont impliquées dans une réduction du TOI cérébral. Si la déformabilité érythrocytaire est connue pour affecter la perfusion tissulaire en oxygène (292), la relation entre le TOI cérébral et l'agrégation érythrocytaire, quant à elle, peut paraître surprenante. Néanmoins nous observons une corrélation inverse (négative) entre le TOI et l'agrégation érythrocytaire chez les sujets AA. Cela suggère l'existence d'un niveau d'agrégation érythrocytaire optimal vis à vis de l'oxygénation cérébrale. Cette hypothèse est

supportée par l'étude de Yalcin et al (419) montrant une relation triphasique entre l'agrégation érythrocytaire et les résistances vasculaires (voir partie V.4).

En outre, notre étude montre que les activités vasomotion et flowmotion cérébrales sont augmentées chez les patients drépanocytaires. Dans la littérature, deux études chez les patients drépanocytaires font part d'une augmentation du flowmotion au niveau de la circulation cutanée (335) (Figure 96) ou encore au niveau de la microcirculation du doigt (233). L'une d'entre elles montre également que cette activité flowmotion augmente en état de crise par rapport à l'état de base (233) (Figure 97). Les auteurs de ces deux études suggèrent que l'augmentation du flux sanguin est causée par une augmentation des résistances vasculaires dans la microcirculation. De plus, dans l'étude de Rodgers et collaborateurs ce phénomène était fortement réduit, voir disparaissait lorsque le niveau d'hémoglobine S descendait sous les 40% après une transfusion sanguine (ce seuil de 40% est étonnamment proche du seuil de 30% retenu pour réduire la survenue de complications cérébrales chez l'enfant drépanocytaire - voir partie III) (335). Néanmoins, nous n'avons pas observé de corrélation entre les paramètres hémorhéologiques (augmentant les résistances à l'écoulement) et l'activité vasomotion (donnée non publiée). Cependant, nous avons observé, chez les patients SS, une corrélation significative entre un niveau de TOI bas et une activité vasomotion élevée. Cette corrélation n'a pas été observée chez les sujets SC sans doute parce que seulement 4 des 20 sujets SC avaient une activité vasomotion véritablement augmentée par rapport aux sujets AA. Cette corrélation entre TOI et vasomotion suggère que c'est la saturation en oxygène de l'hémoglobine qui est le déclencheur de l'activité vasomotion. Pour l'augmentation de l'activité de la Bande I du vasomotion (c.-à-d. 0.009 et 0.02 Hz), ceci est encore accord avec l'hypothèse que le globule rouge est capable d'influencer la vasodilatation des vaisseaux (122, 370) (Voir partie IV.2.1.3.2).

Enfin, nous avons également rapporté, le cas d'un patient SS qui a bénéficié d'une mesure du TOI. Ce patient a une activité flowmotion dépassant très largement celle des autres 295 patients SS. Il s'est avéré, plus tard, que ce patient avait une sténose au niveau des artères cérébrales antérieures et des artères communicantes (*c.-à-d.* les mêmes vaisseaux qui desservent la zone sur laquelle a été placée la sonde du spectroscope dans le proche infrarouge). Ceci nous conduit à penser qu'une mesure de la variabilité du TOI (vasomotion/flowmotion) pourrait permettre de prédire l'arrivée de complications cérébrales. Cependant, cette hypothèse nécessite une étude plus approfondie.



Figure 96. Débit sanguin cutané en fonction du temps mesuré par laser doppler vélocimétrie chez des patients drépanocytaires ("sickle cell"), β^+ -thalassémiques (" β^+ -thalassémic") et contrôles ("normal"). A noter le phénomène de vasomotion présent chez les patients drépanocytaires. D'après (335).



Figure 97. Variabilité de la vitesse des globules rouges ("Vrbc") dans la microcirculation mesurée à la base de l'ongle par microscopie intravitale. HbAA = sujet contrôle, HbSS = sujets drépanocytaires de génotype SS. Le premier tracé est celui d'un sujet contrôle, le second celui d'un patient à l'état stable, le troisième et quatrième tracé ont été réalisés chez des sujets drépanocytaires en crise. Le deuxième et le troisième tracé ont été réalisés chez le même sujet respectivement en état stable et en état de crise. D'après (233).

Hemorheological alterations, decreased cerebral microvascular oxygenation and cerebral vasomotion compensation in sickle cell patients

Xavier Waltz,^{1,2} Aurélien Pichon,³ Danièle Mougenel,⁴ Nathalie Lemonne,⁴ Marie-Laure Lalanne-Mistrih,^{1,5} Stéphane Sinnapah,² Vanessa Tarer,⁶ Benoit Tressières,⁵ Yann Lamarre,¹ Maryse Etienne-Julan,⁴ Olivier Hue,² Marie-Dominique Hardy-Dessources,¹ and Philippe Connes^{1,2*}

Sickle cell anemia (SS) is characterized by a reduced cerebral microvascular oxygen saturation (cerebral TOI), which is not associated with hemoglobin concentration. Cerebral TOI has never been studied in sickle cell-hemoglobin C disease (SC). We focused on the relationships between hemorheological alterations and cerebral TOI in sickle cell patients with no cerebral vasculopathy and on the usefulness of TOI variability to assess the cerebral vasomotion activity. The blood rheological profile, the level of cerebral TOI (spatial resolved spectroscopy) and the cerebral TOI variability, which reflects vasomotion activity, were compared between 20 healthy subjects (AA), 21 SC patients, and 21 SS patients. Cerebral TOI exhibited the following order: AA > SC > SS. The low cerebral TOI variability of SS and SC patients was increased above healthy values and vasomotion activity was negatively associated with the reduced cerebral TOI in SS patients. We demonstrated that (1) blood rheology could be involved in the reduced cerebral TOI in SS patients but not in SC patients; (2) vasomotion activity is increased in SS and SC patients to compensate for the reduced cerebral TOI. Am. J. Hematol. 00:000–000, 2012. \odot 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Introduction

Cerebral microvascular oxygen saturation (cerebral TOI) measured by Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) was demonstrated to be 20–30% lower in asymptomatic patients with sickle cell anemia (SS) than in healthy individuals, which has been interpreted as representing a certain degree of cerebral hypoxia in SS patients [1,2]. The resulting rise of cerebral blood flow [3], if too large, may be a concern for these patients by increasing the risks for cerebral complications such as impaired neurocognitive functions [4] or enhanced risk for stroke [5]. Although the cerebral complications are less frequent in patients with sickle cell-hemoglobin C disease (SC) [6], it is unknown whether this population also suffers from a reduced cerebral TOI.

The causes of cerebral TOI reduction in asymptomatic SS patients have not been elucidated yet. It seems not to be related to the level of anemia [1,2]. Several studies performed in non-sickle cell disease patients have demonstrated that hemorheological properties may be involved in cerebrovascular accident, and might determine blood flow in brain microcirculation and adequate brain perfusion [7–9]. Sickle cell disease (SCD) patients are characterized by wide hemorheological abnormalities, with SS and SC patients having a very different hemorheological profile [10]. But the impact of altered blood rheology on the cerebral TOI of SCD patients is unknown. Studies demonstrated that hydroxyurea therapy in SS patient was able to improve red blood cell (RBC) deformability [11] and also cerebral TOI [12]. Taken together these findings suggest that the hemorheological alterations could be involved in the reduction of the cerebral TOI in SCD.

Despite the fact that cerebral oxygen consumption has been reported to be slightly decreased in few SS patients [13], few previous studies on small SS groups reported that the mean value of cerebral oxygen consumption was close to the normal values [14]. This finding contrasts with the idea that a reduction of the cerebral TOI could be a sign of cerebral hypoxia in SS patients [2]. Although the fact that cerebral oxygen consumption in asymptomatic SS patients appears normal seems surprising, it could be explained by an enhanced vasomotion. Vasomotion is a form of spontaneous localized oscillations induced by spontaneous contraction and relaxation of the muscular components in the small blood vessel walls which generate rhythmic changes in their diameter. Although vasomotion mechanisms are still under debate [15], several studies demonstrated that vasomotion may have beneficial effects on tissue oxygenation [16,17] and can be appreciated by the spectral analysis of the cerebral TOI variability over time [18,19]. This study compared the blood rheological profile, the

This study compared the blood rheological profile, the level of prefrontal cortical microcirculatory oxygen saturation and its variability between healthy subjects (control group, AA) and SS and SC patients without cerebral vasculopathy history. We focused on the relationships between

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

¹UMR Inserm 665, Pointe-à-Pitre, F-97159 Guadeloupe, Université des Antilles et de la Guyane, Pointe-à-Pitre, F-97157, France: ²Laboratoire ACTES (EA 3596), Département de Physiologie, Université des Antilles et de la Guyane, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France; ³Université Paris 13, Laboratoire «Réponses cellulaires et fonctionnelles à l'hypoxie» EA2363, Bobigny, France: ⁴Unité Transversale de la Drépanocytose, Centre Hospitalier et Universitaire de Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, France; ⁵CIC-EC 802 Inserm, Centre Hospitalier Universitaire de Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, France; ⁶Centre de référence maladies rares pour la drépanocytose aux Antilles-Guyane, Centre Hospitalier et Universitaire de Pointe-à-Pitre, Pointeà-Pitre, France

Conflict of interest: Nothing to report

*Correspondence to: Philippe Connes, UMR Inserm 665, Pointe-à-Pitre, F-97159 Guadeloupe, Université des Antilles et de la Guyane, Pointe-à-Pitre, F-97157, France. E-mail: pconnes@yahoo.fr

Contract grant sponsors: Academic Hospital of Pointe-à-Pitre (PHRC CHU de Pointe à Pitre), "Ensemble contre la drépanocytose" and by the regional council of Guadeloupe.

Received for publication 19 July 2012; Accepted 20 July 2012

Am. J. Hematol. 00:000-000, 2012.

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/ajh.23318

1

© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

American Journal of Hematology

http://wileyonlinelibrary.com/cgi-bin/jhome/35105

research article

hemorheological parameters and cerebral microvascular oxygen saturation in sickle cell patients. Moreover, because SC patients are usually less prone than SS patients to cerebrovascular accident [6,20,21], we hypothesized that (1) cerebral microvascular oxygen saturation should be more preserved in SC than in SS patients, in comparison with AA subjects and (2) cerebral microvascular oxygen saturation variability, which reflects vasomotion, should be higher in SS than in SC patients.

Material and Methods

Patients. Sixty-two age- and ethnicity-matched volunteers participated in the study: 20 AA subjects (10 males and 10 females), 21 SC patients (10 males and 11 females) and 21 SS patients (11 males and 10 females).

The SS and SC patients recruited are regularly followed by the Sickle Cell Unit of the Academic Hospital of Pointeà-Pitre (Pointe-à-Pitre, Guadeloupe) and had a magnetic resonance imaging less than 3 months before enrollment to exclude the presence of cerebral vasculopathy or silent cerebral infarcts. All participants were aged ≥ 18 years old and were Afro-Caribbean native from Guadeloupe. SCD patients were in clinical steady state at the time of the study (i.e., without vaso-occlusive crisis, acute medical complication or blood transfusion/phlebotomies within the last 3 months). Exclusion criteria for all subjects were recent infectious episode (in the last month), stroke or cerebral vasculopathy history, β -thalassemia, pregnancy or breast-feeding. Patients taking medication that could affect the hemorheological parameters studied, such as hydroxyurea, were excluded. All participants received verbal and written explanation of the objectives and procedures of the study and subsequently provided written informed consent. The study was approved by the Regional Ethics Committee (CPP Sud-Ouest Outre-Mer III, Bordeaux, France). The experiments were performed in accordance with the guidelines set by the Declaration of Helsinki.

Protocol. For each participant, a physician from the Sickle Cell Unit (Guadeloupe) performed a clinical exam with anthropometric, transcutaneus oxygen saturation (SpO2) and blood pressure measurements. Mean arterial pressure was calculated: 1/3 systolic + 2/3 diastolic pressures. Venous blood was sampled in EDTA tubes from the antecubital vein to perform hematological and hemorheological (blood viscosity, RBC deformability, RBC aggregation and disaggregation properties) measurements. Then, near-infrared spectroscopy (NIRS, NIRO-200, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) measurements were performed for the determination of a tissue oxygenation index (TOI) at the prefrontal cortex and flexor digitorum superficialis muscle levels. The TOI value reflects the microvascular oxygen saturation. The muscular oxygen consumption (mVO₂) was measured by NIRS using the venous occlusions (50 mmHg) method [22].

A Fast Fourier Transform was applied on the cerebral TOI signal for the evaluation of the total power spectrum in the frequency interval 0.004–2 Hz (i.e., total cerebral microvascular oxygen saturation variability) and calculation of the power across 5 band frequencies: interval I (0.004–0.02 Hz) reflects nitric oxide metabolism and/or endothelial function, interval II (0.02–0.06 Hz) depends on neurogenic activity of the vessel wall, and interval III (0.06–0.15 Hz) corresponds to the myogenic activity, interval IV (0.15–0.4 Hz) reflects the breathing frequency and interval V (0.4–2 Hz) is under the influence of heart rate and cardiac output [18]. The whole oscillations recorded (i.e., cerebral TOI variability or total power of the spectrum) reflect the global flowmotion. The low frequency domain (Intervals I, II, and III) corresponds to the vasomotion activity [18].

For additional information on the experimental methods and data analysis techniques, see the online data supplement.

TABLE I. Subjects Characteristics and Hematological Parameters

	AA	SC	SS
Age (yrs)	34.7 ± 11.9	35.9 ± 12.2	33.6 ± 11.9
MAP (mmHg)	91 ± 11	89 ± 12	85 ± 8
SpO ₂ (%)	99.6 ± 0.8	99 ± 1.2	96.0 ± 3.1
Fetal hemoglobin (%)	0.6 ± 0.7	1.3 ± 0.9	7.6 ± 5.4
Hemoglobin S (%)	-	47.4 ± 0.9	83.6 ± 5.7
Hemoglobin C (%)	-	43.4 ± 1.3	-
Hematocrit (%)	41.9 ± 3.2	32.3 ± 2.8	25.2 ± 4.2
Hemoglobin (g/dL)	13.4 ± 1.3	11.1 ± 1.2	8.5 ± 1.0
Reticulocytes (%)	1.1 ± 0.5	2.6 ± 1.6	8.4 ± 3.9

Values represent mean \pm S.D. MAP. mean arterial pressure, SpO₂ = transcutaneus oxygen saturation. Different from control group (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001); different from SC group (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001); different from SC group (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001);

TABLE II. Hemorheological Parameters, Muscular Microvascular Oxygen Saturation, and Muscular Oxygen Consumption

	AA	SC	SS
η <i>b</i> at 225 s ⁻¹ (mPa/s) EI at 3 Pa EI at 30 Pa AI (%) γthr (s ⁻¹) mTOI (%)	$\begin{array}{c} 6.4 \pm 1.1 \\ 0.32 \pm 0.05 \\ 0.59 \pm 0.02 \\ 65.0 \pm 6.5 \\ 149 \pm 40 \\ 62.4 \pm 6.4 \\ 146 \pm 50 \end{array}$	$7.8 \pm 1.2^{\circ\circ}$ $0.17 \pm 0.04^{\circ\circ}$ $0.43 \pm 0.05^{\circ\circ}$ $43.5 \pm 9.2^{\circ\circ}$ $299 \pm 126^{\circ\circ}$ 60.5 ± 7.9 $142 + 65^{\circ}$	$\begin{array}{c} 6.3 \pm 1.5^{111} \\ 0.14 \pm 0.07^{**} \\ 0.34 \pm 0.13^{**} \\ 51.3 \pm 9.7^{**} \\ 361 \pm 169^{**} \\ 53.5 \pm 6.4^{**} \\ 160 + 63 \end{array}$

Results

Subjects' characteristics and hematological parameters

Subjects' characteristics and hematological parameters are summarized in the Table I. Age and mean arterial pressure were not significantly different between the three groups. Transcutaneus oxygen saturation (SpO₂) was significantly lower in SS group than in AA and SC groups.

Fetal hemoglobin level was significantly higher in SS group than in both SC and AA groups. Hemoglobin and hematocrit were different between the three groups: AA > SC > SS. The percentage of reticulocytes was different between the three groups with SS > SC > AA.

Hemorheological parameters

Hemorheological values are shown in Table II. Blood viscosity was higher in SC group than in AA and SS groups. The SS and AA groups were not significantly different regarding blood viscosity. The RBC elongation index at 3 Pa was higher in AA group compared to SC and SS groups and the 16% higher RBC elongation index at 3 Pa in SC patients in comparison with SS patients did not reach statistical significance (Table II). At 30 Pa, the RBC elongation index was significantly different between the three groups: SS < SC < AA. The RBC aggregation index was different between the three groups such as SC < SS < AA. In contrast, the RBC disaggregation threshold was higher in the two SCD groups in comparison with AA subjects.

Muscular TOI and oxygen consumption (mVO₂)

As shown in Table II, the muscular TOI was higher in both AA and SC groups compared with SS group. In contrast, no difference was observed between the three groups for mVO₂ (Table II).

Cerebral TOI

The cerebral TOI (Fig. 1) was higher in AA than in SS group. SC patients exhibited an intermediate level. The



Figure 1. Cerebral microvascular oxygen saturation (cerebral TOI) in AA, SC and SS groups. Different from AA group (***P < 0.001); different from SC group (¹¹;P < 0.001). AA and SC were not significantly different (P = 0.08).

presence of α -thalassemia in SS or SC patients had no effect on the cerebral TOI (data not shown).

In AA group, cerebral TOI was positively correlated with hemoglobin concentration (r = 0.62; P < 0.01) and negatively correlated with the RBC aggregation index (r 0.63; P < 0.01). No correlation was observed between cerebral TOI and SpO2, RBC elongation index, blood viscosity, RBC disaggregation index, percentage of reticulocytes or vasomotion activity in AA group. In the SC group, no correlation was found between cerebral TOI and hemoglobin concentration, percentage of reticulocytes, SpO2, blood rheology or vasomotion activity. In the SS group, we observed positive correlations between cerebral TOI and RBC elongation index at 3 Pa (r = 0.54; P < 0.05), and cerebral TOI and RBC aggregation index (r = 0.54; p 0.05). At 30 Pa, the positive association between RBC elongation index and cerebral TOI tended to be significant 0.43; P = 0.055). Moreover, a negative correlation was observed between cerebral TOI and vasomotion activity (r = -0.61; P = 0.004) in SS patients. No correlation was observed between cerebral TOI and SpO2, hemoglobin concentration, percentage of reticulocytes, blood viscosity, or the RBC disaggregation threshold in SS patients.

Cerebral TOI variability

Figure 1 Supporting Information material shows typical examples of cerebral TOI recordings in one AA, SC, and SS subject. The total power of the signal (i.e., cerebral TOI variability) was significantly different between the three groups: SS > SC > AA (Fig. 2). Figure 2a,b Supporting Information materials show the power spectral density in the five frequency intervals with SS > SC > AA.

Discussion

This study demonstrates that (1) cerebral microvascular oxygen saturation (cerebral TOI) is lower in asymptomatic SS adults in comparison with the control group, and SC patients have an intermediate level; (2) the whole cerebral TOI variability and the power spectral density in each frequency interval are higher in sickle cell patients (intermediate level; for SC group) than in the control group reflecting higher flowmotion and vasomotion; (3) the lower cerebral TOI in SS or SC patients is not related to the degree of anemia; (4) the cerebral TOI of SS patients is correlated with vasomotion activity and RBC rheological properties; (5) no relationship is observed between the hemorheological parameters and cerebral TOI in SC group.

We showed that cerebral TOI was lower in asymptomatic SS patients (i.e., without cerebral vasculopathy history) than in AA group. SC patients exhibited an intermediate cerebral TOI level (Fig. 1). This is the first study giving information about cerebral TOI in SC patients compared to a



Figure 2. Fast Fourier transform analysis of TOI signal for total power spectral density (flowmotion activity).* Different from AA group (P < 0.05); ¹different from SC group (P < 0.05).

group of healthy subjects. Cerebral TOI is of primary importance since a reduction of cerebrovascular oxygen saturation may result in a rise of the cerebral blood flow [3] and could precede the appearance of cerebral complications [4,23].

We did not find any correlation between the cerebral TOI and hemoglobin concentration in the sickle cell groups indicating that anemia is probably not the only factor involved in the decreased cerebral microvascular oxygen saturation of SS or SC patients, as previously reported [1,2]. This finding contrast with a very recent study performed in SCD children [24]. The lack of correlation between cerebral TOI and SpO₂ in SS or SC patients supports previous findings [2] and suggests that systemic hypoxia could be not the main cause of the reduced cerebral TOI in SCD.

Our results demonstrated that the cerebral TOI of AA group was not related to RBC deformability. The RBC deformability in the healthy AA subjects is probably optimal and does not disturb the microvascular blood flow and, hence, cerebral TOI. For SCD patients, only the SS group demonstrated a positive correlation between RBC deformability and cerebral TOI suggesting that a greater RBC deformability in this group positively affects cerebral TOI. In this way, Parthasarathi and Lipowsky [25] demonstrated that reduced RBC deformability in rat cremaster muscle severely affected tissue oxygenation. In contrast, our findings do not support a key role of RBC deformability on the cerebral TOI modulation of SC patients.

The cerebral TOI of AA subjects was negatively related to RBC aggregation which supports previous findings showing that RBC aggregation properties may strongly affect hemodynamics and vascular resistance in both the macroand microcirculation [26,27]. Although we did not observe any correlation between the low RBC aggregation level and the reduced cerebral TOI in SC patients, we reported a surprising positive correlation between these parameters in SS patients suggesting that a rise of RBC aggregation in this population could be associated with cerebral TOI improvement. This result contrasts drastically with the finding reported in the AA group and with the traditional view that increased RBC aggregation may impair microcirculation. However, the SS group had a 21% RBC aggregation reduction in comparison with controls. Yalcin et al. [28] studied the effects of a graded increase of RBC aggregation on the blood flow resistance in guinea pig hind limb and found a tri-phasic relation suggesting that there is an optimal level of RBC aggregation to reduce blood flow resistance and provide adequate tissue perfusion.

The larger total spectral power variability of cerebral TOI and the greater absolute power of each frequency interval of the cerebral TOI signal suggest higher cerebral flowmotion and vasomotion [29,30] in SCD patients than in con-

research article

trols which can be interpreted as a mechanism to compensate for the reduced cerebral TOI [17,30]. The low deformable RBCs in SCD patients could trigger an oscillatory vasomotion pattern that helps to maintain the microvascular blood flow and tissue oxygenation by rheological abnormal SCD blood [20,21]. This is supported by a significant negative correlation found between vasomotion activity and RBC deformability at 3 Pa in SS patients (r = -0.54; P < 0.05).

Although the decreased cerebral TOI and the increased TOI variability could support the presence of a certain degree of cerebral hypoxia in SS patients, and to a lesser extent in some SC patients, we did not measure the cerebral oxygen consumption in this study. Few previous studies on small asymptomatic SS groups reported that the mean value of cerebral oxygen consumption was close to the normal values [14] suggesting that, even if the cerebral TOI is reduced in this population, enough oxygen could be provided for brain functioning. The measurements of muscular TOI and mVO2 in our patients support this hypothesis with mVO₂ being normal in SS patients despite a reduction of muscular TOI (i.e., -8.9%). This result demonstrates that a reduction of TOI is not always a synonym of tissue hypoxia. Although the RBCs rheological alterations could impair the cerebrovascular flow and participate to the decrease of the cerebral oxygen reserve in SCD patients, the reduced hemoglobin S affinity for oxygen [31] could result in a higher oxygen release to the tissues in SS and SC patients, hence participating in the decrease of cerebral TOI but limiting to some extent tissue hypoxia. In addition, we suspect that the increased vasomotion activity in SS and SC patients limits brain hypoxia.

The clinical meanings of reduced cerebral TOI and enhanced cerebral TOI variability in SCD have never been studied and this was not the aim of this study. Nevertheless, we had the case of a SS patient (not included in this study) who presented not excessively low cerebral TOI (i.e., 62.4%) but a very surprising TOI variability with values ranging intermittently between 0 and 99% (data not shown). On the basis of this very large TOI variability, it was asked to the patient to perform magnetic resonance imaging which demonstrated the presence of an intermittent trickle flow at the level of the anterior cerebral and anterior communicating arteries. This observation suggests that the presence of an excessive cerebral periodic microcirculatory flow could reflect severe cerebrovascular complications in SCD, as it can be the case at the peripheral level [32].

In conclusion, we demonstrated that asymptomatic SCD patients without a history of vasculopathy had lower cerebral microvascular oxygen saturation than normal subjects. This lower cerebral microvascular oxygen saturation was not related to the degree of anemia or to the systemic arterial oxygen saturation level but could be related to the reduced deformability and aggregation properties of RBCs. Moreover, although the cerebral microvascular oxygen saturation was reduced in SCD patients, the cerebral flowmotion and vasomotion activities were higher than in the control group, with the higher activity found in SS patients. This higher cerebral vasomotion activity could be a way to compensate for the reduced cerebral microvascular oxygen saturation. Future longitudinal studies will have to assess if a reduced cerebral microvascular oxygen saturation and an enhanced vasomotion activity could be predictor of cerebrovascular complications in SCD.

Author Contributions

4

X.W., A.P., D.M., N.L., M.L.L.M., B.T., M.E.J., O.H., M.D.H.D. and P.C. designed the research; X.W., D.M., N.L., S.S., V.T., B.T., Y.L. and P.C. performed experiments; X.W., A.P., B.T. and P.C. analyzed results and made the figures; X.W., A.P. and P.C. interpreted data; X.W., A.P., D.M., N.L.,

M.L.L.M, S.S., V.T., B.T., Y.L., M.E.J., O.H., M.D.H.D. and P.C. wrote and comments the article.

References

- Raj A. Bertolone SJ. Mangold S. et al. Assessment of cerebral tissue oxygenation in patients with sickle cell disease: Effect of transfusion therapy. J Pediatr Hematol Oncol 2004;26:279-283.
- Nahavandi M, Tavakkoli F, Hasan SP, et al. Cerebral oximetry in patients with sickle cell disease. Eur J Clin Invest 2004;34:143–148.
- 3. Brown MM, Wade JP, Marshall J. Fundamental importance of arterial oxygen content in the regulation of cerebral blood flow in man. Brain 1985:108 (Part 1):81-93
- 4. Strouse JJ, Cox CS, Melhem ER, et al. Inverse correlation between cerebral blood flow measured by continuous arterial spin-labeling (CASL) MRI and neurocognitive function in children with sickle cell anemia (SCA). Blood 2006-108-379-381
- Adams RJ. Big strokes in small persons. Arch Neurol 2007;64:1567-1574. Ohene-Frempong K. Weiner SJ, Sleeper LA, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: Rates and risk factors. Blood 1998;91:288–294. 6.
- Bolokadze N. Lobianidze I. Momtselidze N. et al. Comparison of erythrocyte aggregability changes during inschemic and hemorrhagic stroke. Clin He heol Microcirc 2006;35:265–267.
- McHedlishvili G. Lobjanidze I, Momtselidze N. et al. About spread of local cerebral hemorheological disorders to whole body in critical care patients. Clin Hemorheol Microcirc 2004;31:129-138.
- 9. McHedlishvili G. Varazashvili M, Mamaladze A, et al. Blood flow structuring and its alterations in capillaries of the cerebral cortex. Microvasc Res 1997:53:201-210.
- 10. Tripette J, Alexy T, Hardy-Dessources MD, et al. Red blood cell aggregation, aggregate strength and oxygen transport potential of blood are abnormal in both homozygous sickle cell anemia and sickle-hemoglobin C disease. Haematologica 2009:94:1060-1065.
- Athanassiou G, Moutzouri A, Kourakli A. et al. Effect of hydroxyurea on the 11. deformability of the red blood cell membrane in patients with sickle cell ane mia. Clin Hemorheol Microcirc 2006;35:291-295.
- 12. Tavakkoli F. Nahavandi M. Wyche MQ, et al. Effects of hydroxyurea treatment label pilot study. Clin Ther 2005;27:1083–1088.
- 13. Heyman A, Patterson JL Jr, Duke TW. Cerebral circulation and metabolism in sickle cell and other chronic anemias, with observations on the effects of oxygen inhalation. J Clin Invest 1952:31:824-828.
- Herold S, Brozovic M, Gibbs J, et al. Measurement of regional cerebral blood flow, blood volume and oxygen metabolism in patients with sickle cell disease using positron emission tomography. Stroke 1986;17:692-698.
- 15. Aalkjaer C, Boedtkjer D, Matchkov V. Vasomotion what is currently thought? Acta Physiol (Oxf) 2011;202:253-269.
- 16. Thorn CE, Kyte H, Slaff DW, et al. An association between vasomotion and xygen extraction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011;301:H442-H449
- Kislukhin VV. Stochasticity of flow through microcirculation as a regulator of oxygen delivery. Theor Biol Med Model 2010;7:29.
 Li Z. Wang Y, Li Y, et al. Wavelet analysis of cerebral oxygenation signal measured by near infrared spectroscopy in subjects with cerebral infrarction. Microcirco Res 2010;80:142, 147. Microvasc Res 2010;80:142-147.
- 19. Schroeter ML, Schmiedel O, von Cramon DY. Spontaneous low-frequency oscillations decline in the aging brain. J Cereb Blood Flow Metab 2004:24:1183-1191
- 20. Kaul DK. Fabry ME. In vivo studies of sickle red blood cells. Microcirculation 2004:11:153-165
- 21. Rodgers GP, Schechter AN, Noguchi CT, et al. Periodic microcirculatory flow in patients with sickle-cell disease. N Engl J Med 1984;311:1534-1538. Van Beekvelt MC, Colier WN, Wevers RA, et al. Performance of near-infrared
- spectroscopy in measuring local O(2) consumption and blood flow in skeletal muscle. J Appl Physiol 2001:90:511-519.
- Adams R, McKie V, Nichols F, et al. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. N Engl J Med 1992;326:605–610.
- Quinn CT. Dowling MM. Cerebral tissue hemoglobin saturation in children with sickle cell disease. Pediatr Blood Cancer 2012.
- Parthasarathi K, Lipowsky HH. Capillary recruitment in response to tissue hy-poxia and its dependence on red blood cell deformability. Am J Physiol 1999:277:H2145-H2157.
- 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;15:585-590.
- 27 Baskurt OK, Meiselman HJ. Hemodynamic effects of red blood cell aggregation. Indian J Exp Biol 2007;45:25-31.
- 28. Yalcin O, Uyuklu M, Armstrong JK, et al. Graded alterations of RBC aggregation influence in vivo blood flow resistance. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004:287:H2644-H2650.
- Vetri F. Menicucci D, Lapi D, et al. Pial arteriolar vasomotion changes during cortical activation in rats. Neuroimage 2007:38:25-33. 30. Bertuglia S, Colantuoni A, Coppini G, et al. Hypoxia- or hyperoxia-induced
- changes in arteriolar vasomotion in skeletal muscle microcirculation. Am J Physiol 1991;260:H362-H372.
- Becklake MR, Griffiths SB, Mc GM, et al. Oxygen dissociation curves in sickle cell anemia and in subjects with the sickle cell trait. J Clin Invest 1955;34:751–755.
- 32. Lipowsky HH, Sheikh NU, Katz DM. Intravital microscopy of capillary hemodynamics in sickle cell disease. J Clin Invest 1987:80:117-127.

American Journal of Hematology

Supplemental online material

Hemorheological alterations, decreased cerebral microvascular oxygenation and cerebral vasomotion compensation in sickle cell patients

Xavier Waltz^{a,b}, Aurélien Pichon^c, Danièle Mougenel^d, Nathalie Lemonne^d, Marie-Laure Lalanne-Mistrih^{a,e}, Stéphane Sinnapah^b, Vanessa Tarer^f, Benoit Tressières^e, Yann Lamarre^a, Maryse Etienne-Julan^d, Olivier Hue^b, Marie-Dominique Hardy-Dessources^a, Philippe Connes^{a,b}.

^aUMR Inserm 665, Pointe-à-Pitre, F-97159 Guadeloupe, Université des Antilles et de la Guyane, Pointe-à-Pitre, F-97157, France ; ^bLaboratoire ACTES (EA 3596), Département de Physiologie, Université des Antilles et de la Guyane, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France ; ^cUniversité Paris 13, Laboratoire «Réponses cellulaires et fonctionnelles à l'hypoxie» EA2363, Bobigny, France ; ^dUnité Transversale de la Drépanocytose, Centre Hospitalier et Universitaire de Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, France ; ^eCIC-EC 802 Inserm, Centre Hospitalier Universitaire de Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, France ; ^fCentre de référence maladies rares pour la drépanocytose aux Antilles-Guyane, Centre Hospitalier et Universitaire de Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, France

Running title: Sickle cell disease and cerebral oxygenation

Corresponding author: Philippe Connes, PhD: UMR Inserm 665, Pointe-à-Pitre, F-97159 Guadeloupe, Université des Antilles et de la Guyane, Pointe-à-Pitre, F-97157, France; email: pconnes@yahoo.fr; Tel: (+590) 590 83 48 99; Fax: (+590) 590 83 05 13.

Material and methods

Hematological parameters

Hematocrit was measured after blood microcentrifugation (JOUAN-HEMA-C, Saint Herblain, France). Hemoglobin concentration and percentages of reticulocytes were determined using a hematology analyzer (Max M-Retic, Coulter, USA).

Hemorheological parameters

Hemorheological parameters were measured within the four hours after sampling and after full re-oxygenation of blood for 10-15 min [1]. Blood viscosity was measured at native hematocrit and at room temperature ($\approx 25^{\circ}$ C) using a cone-plate viscometer (Brookfield DVII+ with CPE40 spindle) at 225 s⁻¹. The RBC elongation index values were determined at two shear stresses (3 and 30 Pa) by laser diffraction analysis (ecktacytometry) and at 37°C, using the Laser assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA, RR Mechatronics, Hoorn, The Netherlands). The system calculates an average RBC elongation index. The higher this index, the more deformable the RBCs. RBC aggregation was determined at 37°C via syllectometry (i.e., laser backscatter versus time), using the LORCA (RR Mechtronics, Hoom, The Netherlands), after adjustment of hematocrit to 40%. The system calculates an aggregation index. The disaggregation threshold -i.e., the minimal shear rate needed to prevent RBC aggregation or to break down existing RBC aggregates - was determined using a re-iteration procedure. Note that the disaggregation threshold mainly reflects the RBC aggregate strength while the aggregation index is a measure of the extent of aggregation integrated during a time period of 2 minutes. Hemorheological measurements were performed according to the guidelines for hemorheological laboratory techniques [1].

Determination of muscular and cerebral microvascular oxygen saturation, and muscular oxygen consumption by near-infrared spectroscopy (NIRS)

Near-infrared spectroscopy (NIRS) techniques have been described elsewhere [2]. Briefly, NIRS principle is based on the relative transparency of tissue to light in the near-infrared region between 700nm and 1000nm, and on the oxygen-dependent absorption changes of hemoglobin. NIRS can be used in sickle cell patients since the near-infrared spectra absorbance of hemoglobin S is comparable to the one of normal hemoglobin [3].

The relative concentration changes of oxygenated hemoglobin (Δ HbO₂), deoxygenated hemoglobin (Δ HHb), total hemoglobin (Δ cHb) and tissue oxyhemoglobin saturation expressed as a tissue oxygenation index (TOI) were measured continuously and simultaneously throughout the experiment at the prefrontal cortex and flexor digitorum superficialis muscle levels using two channels of a three-wavelength (775nm, 810nm, 850nm) high temporal resolution NIRS device (NIRO-200, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan). The TOI is given by [Δ HbO₂ / (Δ HHb + Δ HbO₂)] x100. The TOI value reflects the microvascular oxygen saturation at the local region of muscle or brain situated between emission and detection probes. TOI has been shown to be independent of skull thickness and of the area of the cerebrospinal fluid layer underlying the probes since this variable is measured by spatial resolved spectroscopy [4].

Two probes were firmly attached at the flexor digitorum superficialis muscle level and two other ones were fixed on the forehead at prefrontal cortex level (between Brodmann Area 10 and Brodmann Area 46 to avoid sagittal and frontal sinuses) by means of a medical adhesive (Hamamatsu photonics, Massy, France) for measurement of TOI in both muscular and cerebral microcirculation during 10 min at 6 Hz. The subjects were installed in a comfortable

position with a thighs-trunk angle of 110° and were asked to remain quiet for 10 minutes before the TOI measurements (10 minutes). The inter-probes distance was 4 cm.

The muscular oxygen consumption (mVO₂) was measured by NIRS by means of three consecutive venous occlusions (50 mmHg) separated by one minute of recovery. The mVO₂ was determined in a subset of subjects with comparable adipose tissue thickness covering the flexor digitorum superficialis muscle (16 AA – 9 males and 7 females, 20 SC – 10 males and 10 females, and 16 SS – 8 males and 8 females) since adipose tissue thickness may affect NIRS signals measured with the modified Beer Lambert method (e.g., Δ HHb) [5]. All venous occlusions lasted 30 seconds and mVO₂ corresponded to the rate of Δ HHb increase within the first seconds of the 30 seconds venous occlusion [6]. The average mVO₂ was calculated on the three venous occlusions.

Spectral analysis of cerebral microvascular oxygen saturation variability

The cerebral microcirculatory blood flow is variable across the time for a given subject and this cerebral microcirculatory blood flow variability reflects cerebral flowmotion and vasomotion [7]. In patients experiencing subarachnoid hemorrhage, cerebral TOI variability has been demonstrated to be well correlated with the cerebral blood flow variability to assess cerebral autoregulation [8]. Cerebral TOI exhibits spontaneous oscillations in five frequency components. The Fast Fourier Transform (Welch's periodogram method) was applied on the cerebral TOI signal for the evaluation of the total power spectrum in the frequency interval 0.004-2 Hz (*i.e.*, total cerebral microvascular oxygen saturation variability) and calculation of the power across 5 band frequencies. The upper limit of 2 Hz was set to include the heart rate frequency, while the lower limit was chosen to include the three low frequencies intervals usually observed in brain TOI signals [7, 9]. Although the meaning of each interval frequency

power at the cerebral level is debated [9] and not fully resolved, interval I (0.004-0.02 Hz) reflects nitric oxide metabolism and/or endothelial function, interval II (0.02-0.06 Hz) depends on neurogenic activity of the vessel wall, and interval III (0.06-0.15 Hz) corresponds to the myogenic activity. For the high oscillatory activities, interval IV (0.15-0.4 Hz) reflects the breathing frequency and interval V (0.4-2 Hz) is under the influence of heart rate and cardiac output [7]. The whole oscillations recorded (*i.e.*, cerebral TOI variability or total power of the spectrum) reflect the global flowmotion. The flowmotion results from the motion of the blood cells and their interaction with the vessel walls. The low frequency domain (intervals I, II and III) corresponds to the vasomotion activity [7].

Statistics

All values were expressed as means \pm standard deviations. The data were tested for the normality (Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity of variance (Levene test). Anthropometric, physiological, hematological, hemorheological, muscular and cerebral oxygenation parameters were compared between the three groups using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Newman-Keuls post-hoc test. When the rules for parametric test application were not fulfilled, a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test were used. Pearson test was used to test linear correlation between cerebral TOI and hemoglobin concentration or hemorheological parameters. Non-parametric Spearman correlation was performed between cerebral TOI and SpO₂ or vasomotion activity. The significance level was defined as p < 0.05. Analyses were conducted using SigmaStat (v. 3.5, Systat Sofware, Erkrath, Germany).

References

1. Baskurt OK, Boynard M, Cokelet GC, et al. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. Clin Hemorheol Microcirc 2009;42:75-97.

2. Perrey S. Non-invasive NIR spectroscopy of human brain function during exercise. Methods 2008;45:289-299.

3. Nahavandi M, Nichols JP, Hassan M, et al. Near-infrared spectra absorbance of blood from sickle cell patients and normal individuals. Hematology 2009;14:46-48.

4. Yoshitani K, Kawaguchi M, Miura N, et al. Effects of hemoglobin concentration, skull thickness, and the area of the cerebrospinal fluid layer on near-infrared spectroscopy measurements. Anesthesiology 2007;106:458-462.

5. van Beekvelt MC, Borghuis MS, van Engelen BG, et al. Adipose tissue thickness affects in vivo quantitative near-IR spectroscopy in human skeletal muscle. Clin Sci (Lond) 2001;101:21-28.

6. Van Beekvelt MC, Colier WN, Wevers RA, et al. Performance of near-infrared spectroscopy in measuring local O(2) consumption and blood flow in skeletal muscle. J Appl Physiol 2001;90:511-519.

7. Li Z, Wang Y, Li Y, et al. Wavelet analysis of cerebral oxygenation signal measured by near infrared spectroscopy in subjects with cerebral infarction. Microvasc Res 2010;80:142-147.

8. Zweifel C, Castellani G, Czosnyka M, et al. Continuous assessment of cerebral autoregulation with near-infrared spectroscopy in adults after subarachnoid hemorrhage. Stroke 2010;41:1963-1968.

9. Vetri F, Menicucci D, Lapi D, et al. Pial arteriolar vasomotion changes during cortical activation in rats. Neuroimage 2007;38:25-33.

Figure 1 supplemental online material. Illustration of the variability of cerebral TOI's signal for one AA (on the left), **one** SC (middle) and **one** SS (right) subject (online supplement).



Figure 2 supplemental online material. Power spectral density in interval I, II and III (2A, vasomotion activity) and power spectral density in interval IV, V (2B) (online supplement). Interval I = endothelial activity and/or nitric oxide metabolism), interval II = neurogenic activity, interval III = myogenic activity, interval IV = breathing frequency and interval V heart rate and cardiac output. * Different from AA group (p < 0.05); [†] different from SC group (p < 0.05).

Figure 2 supplemental online material



X.4 ETUDE N°4

Muscle oxygen consumption is normal in sickle cell disease despite reduced muscle microvascular oxygenation and hemorheological abnormalities. *Plos One* ; sous presse. IF : 4,092.

X. Waltz, A. Pichon, D. Mougenel, N. Lemonne, M.L Lalanne-Mistrih, V. Tarer, B. Tressières, Y. Lamarre, M. Etienne-Julan, O. Hue, M.D Hardy-Dessources, P. Connes.

Plusieurs études, ainsi que notre étude n°1, ont montré que les capacités à l'exercice étaient réduites chez les patients atteints de la drépanocytose (20, 71, 254). Plusieurs causes ont été avancées dont une altération de la fonction musculaire (71). Si l'hémodynamique et la perfusion en oxygène au niveau cérébral sont au centre des recherches, aucune étude à notre connaissance ne s'est intéressée à ces paramètres au niveau musculaire.

Pour cette raison, nos objectifs étaient d'étudier, chez des patients SC et SS comparés à un groupe contrôle AA, si 1) l'apport et la consommation en oxygène par le muscle au repos étaient altérés, 2) d'observer si cela pouvait se traduire par une fatigabilité musculaire augmentée, et enfin 3) d'identifier les facteurs indépendamment associés à la consommation musculaire en oxygène.

Cette expérimentation a été réalisée en même temps et sur la même population que l'étude n°3 (voir partie IX.2.4). Pour le protocole de cette étude voir la Figure 98 ci-dessous.



Figure 98. Protocole de l'étude n°4. TOI = saturation en oxygène au niveau de la microcirculation ("tissu oxygen index"), CMV = contraction maximale volontaire.

Nos résultats ont montré une VO₂ musculaire et une fatigabilité musculaire normale chez les patients SC et SS comparés au groupe contrôle AA et ce malgré la présence d'altérations hématologiques et hémorhéologiques. Néanmoins, pour le groupe SS uniquement, le TOI musculaire était réduit et le débit sanguin augmenté. La réduction du TOI chez les patients SS n'était pas corrélée aux altérations hémorhéologiques.

D'autre part, les activités vasomotion et flowmotion étaient comparables entre les troisgroupes. Enfin, l'analyse multivariée a révélé que la VO₂ musculaire était associée au TOI pour le groupe contrôle AA et avec le débit sanguin de la microcirculation musculaire chez les patients SC et SS. Pour le groupe SC, la VO₂ musculaire était également associée au seuil de désagrégation érythrocytaire.

Les résultats obtenus de notre étude suggèrent que les patients drépanocytaires, ayant une sévérité clinique modérée, n'ont pas d'altérations de la consommation d'oxygène au niveau musculaire comparés à un groupe contrôle AA. D'autre part, les résultats de l'exercice intermittent de Handgrip montrent que, pour un effort modéré et de courte durée, la fatigabilité musculaire n'était pas supérieure chez les patients drépanocytaires par rapport à un groupe contrôle. Bien que la VO₂ musculaire n'ait pas été mesurée durant cet exercice e, ce résultat suggère que la VO₂ musculaire n'est pas altérée pour un exercice d'intensité légère. Lonsdorfer et collaborateur ont montré que pour un exercice aérobie d'intensité légère (50 W) réalisé sur vélo, la consommation d'oxygène globale des patients drépanocytaire SS n'était pas différente du groupe contrôle AA (234). Dans cette étude, la consommation d'oxygène globale était maintenue par une augmentation 2,5 fois plus importante du travail cardiaque chez les sujets SS comparés aux sujets contrôle AA (234). Par ailleurs, leur étude montre également que la pression partielle en oxygène dans le sang veineux mêlé restait de ce fait plus importante chez les sujets SS comparés aux sujets contrôle (46,5 Vs 39 mmHg respectivement). Ce résultat est important car une PO₂ élevée maintenue à la sortie des tissus signifie que la désaturation de l'hémoglobine en oxygène 312 n'est sans doute pas augmentée chez les sujets drépanocytaires par rapport à des sujets contrôles (P50 de 35,8 vs 26 mmHg respectivement) (234). Ainsi une augmentation du débit cardiaque permet d'éviter une désaturation de l'hémoglobine trop importante qui favoriserait la polymérisation de l'hémoglobine S (en plus de maintenir une VO₂ adéquate). Dans ce sens, les résultats de notre étude suggèrent que l'augmentation du travail cardiaque observée par Lonsdorfer et collaborateur se traduit également au niveau musculaire par une augmentation du débit sanguin dans la microcirculation. Cette augmentation du débit sanguin dans la microcirculation musculaire est sans doute en partie attribuable à une hyperhémie fonctionnelle (voir partie IV). D'autres facteurs peuvent également expliquer la présence de cette augmentation du flux sanguin dans la microcirculation musculaire comme l'architecture des microvaisseaux. En effet, Vincent et collaborateurs ont montré que les porteurs du trait drépanocytaire étaient caractérisés par des capillaires moins tortueux et plus larges favorisant le passage des érythrocytes (399). Ce phénomène pourrait être également être présent chez les patients drépanocytaires et expliquer en partie l'augmentation de la vitesse du flux observée dans notre étude au niveau de la microcirculation musculaire.

D'autre part, la présence d'une association indépendante entre la VO₂ musculaire et le seuil de désagrégation érythrocytaire chez les patients SC peut s'expliquer par une augmentation de la difficulté à rompre les agrégats érythrocytaires à l'entrée de la microcirculation (35). La présence de cette association dans le groupe SC et non dans le groupe SS peut s'expliquer par la vitesse de cisaillement plus importante chez les patients SS du fait d'un débit sanguin augmenté dans la microcirculation.

Enfin, nous avons également observé que l'activité vasomotion était comparable entre les trois groupes suggérant qu'au niveau musculaire, ce phénomène joue un rôle moins important dans la régulation de la perfusion tissulaire en oxygène qu'au niveau cérébral.

313

Normal muscle oxygen consumption and fatigability in sickle cell patients despite reduced microvascular oxygenation and hemorheological abnormalities

Xavier Waltz^{a,b,c}, Aurélien Pichon^{b,d}, Nathalie Lemonne^e, Danièle Mougenel^e, Marie-Laure Lalanne-Mistrih^{a,f}, Yann Lamarre^{a,b}, Vanessa Tarer^g, Benoit Tressières^f, Maryse Etienne-Julan^e, Marie-Dominique Hardy-Dessources^{a,b}, Olivier Hue^c, and Philippe Connes^{a,b,c}.

^aInserm 665, Pointe-à-Pitre, F-97159 Guadeloupe, Université des Antilles et de la Guyane, Pointe-à-Pitre, F-97157, France ; ^bLaboratory of Excellence GR-Ex « The red cell : from genesis to death », PRES Sorbonne Paris Cité, 75015, Paris, France ; ^cUniversité des Antilles et de la Guyane, Laboratoire ACTES (EA 3596), Département de Physiologie, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France ; ^dUniversité Paris 13, PRES Sorbonne Paris Cité, Laboratoire «Réponses cellulaires et fonctionnelles à l'hypoxie» EA2363, Bobigny, France ; ^e Unité Transversale de la Drépanocytose, Centre Hospitalier et Universitaire de Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France ; ^fCIC-EC 802 Inserm, Centre Hospitalier Universitaire de Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France ; ^gCentre de référence maladies rares pour la drépanocytose aux Antilles-Guyane, Centre Hospitalier et Universitaire de Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France.

Corresponding author: Philippe Connes, PhD: UMR Inserm 665, CHU de Pointe-à-Pitre, 97159, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France; email: <u>pconnes@yahoo.fr</u>; Tel: (+590) 590 83 48 99 ; Fax: (+590) 590 83 05

Key words: muscle oxygenation, blood rheology, muscle strength, sickle cell syndromes

Abstract

Background/Aim: Although it has been hypothesized that muscle metabolism and fatigability could be impaired in sickle cell patients, no study has addressed this issue. Methods: We compared muscle metabolism and function (muscle microvascular oxygenation, microvascular blood flow, muscle oxygen consumption and muscle microvascular oxygenation variability, which reflects vasomotion activity, maximal muscle force and local muscle fatigability) and the hemorheological profile at rest between 16 healthy subjects (AA), 20 sickle cell-hemoglobin C disease (SC) patients and 16 sickle cell anemia (SS) patients. Results: Muscle microvascular oxygenation was reduced in SS patients compared to the SC and AA groups and this reduction was not related to hemorhelogical abnormalities. No difference was observed between the three groups for oxygen consumption and vasomotion activity. Muscle microvascular blood flow was higher in SS patients compared to the AA group, and tended to be higher compared to the SC group. Multivariate analysis revealed that muscle oxygen consumption was independently associated with muscle microvascular blood flow in the two sickle cell groups (SC and SS). Finally, despite reduced muscle force in sickle cell patients, their local muscle fatigability was similar to that of the healthy subjects. Conclusions: Sickle cell patients have normal resting muscle oxygen consumption and fatigability despite hemorheological alterations and, for SS patients only, reduced muscle microvascular oxygenation and increased microvascular blood flow. Two alternative mechanisms can be proposed for SS patients: 1) the increased muscle microvascular blood flow is a way to compensate for the lower muscle microvascular oxygenation to maintain muscle oxygen consumption to normal values or 2) the reduced microvascular oxygenation coupled with a normal resting muscle oxygen consumption could indicate that there is slight hypoxia within the muscle which is not sufficient to limit mitochondrial respiration but increases muscle microvascular blood flow.

Introduction

Patients with sickle cell disease (SCD) are characterized by anemia and altered blood rheology which may impair blood flow [1], trigger vaso-occlusive crisis, cause tissue ischemia [2,3,4] and limit exercise capacity [5].

Few studies investigated baseline microvascular oxygenation at the cerebral level in SCD patients and reported reduced values suggesting a certain degree of chronic cerebral hypoxia [6,7,8]. But, it is unknown whether it is also the case in other organs. Callahan et al [9] previously suggested that muscle function could be altered in some patients with SCD. Moreover, it has been proposed [10] that reduced red blood cell (RBC) deformability in rat *cremaster* muscle could severely affects capillary recruitment and tissue oxygenation. Indeed, one may suggest that the reduced RBC deformability in SCD, in association with the other blood rheological abnormalities, could reduce muscle microcirculatory oxygenation, muscle oxygen consumption and impair muscle function in this population.

However, Rodgers et al [11] previously reported high periodic microvascular blood flow oscillations at the skin level of sickle cell patients (*i.e.*, high flowmotion and vasomotion activities) which might be helpful to maintain the microvascular blood flow despite the presence of hemorheological disturbances. Vasomotion is a form of spontaneous localized oscillations induced by spontaneous contraction and relaxation of the smooth muscle components in the small blood vessel walls which generate rhythmic changes in their diameter. Although vasomotion mechanisms are still under debate [12], several studies demonstrated that vasomotion may have beneficial effects on tissue oxygenation [13,14,15]. Therefore the hypothesis of a reduced muscle microvascular oxygenation in SCD patients,

due to abnormal hemorheology, compensated by a greater vasomotion activity needs to be tested.

Because SCD patients are characterized by wide hemorheological disturbances, we hypothesized that muscle microvascular oxygenation (TOI), muscle oxygen consumption (VO₂) and muscle function (*i.e.*, maximal force and fatigability during a short local handgrip exercise) should be impaired in patients with sickle cell anemia (SS) or sickle cell-hemoglobin C disease (SC) in comparison with a control group (AA). We also hypothesized that vasomotion activity could be greater in SCD patients in order to limit muscle VO₂ reduction. Since the level of VO₂ is critical for tissue survival we tried to identify factors associated with local muscle VO₂. We demonstrated that sickle cell patients have normal resting muscle oxygen consumption and fatigability despite hemorheological alterations and, for SS patients only, reduced muscle microvascular oxygenation.

Materials and methods

Patients

The study was approved by the Regional Ethics Committee (CPP Sud-Ouest Outre-Mer III, Bordeaux, France). The experiments were performed in accordance with the guidelines set by the Declaration of Helsinki.

Fifty-two Guadeloupean volunteers (Table 1) participated in the study: 16 healthy subjects with no hemoglobinopathy (AA; 9 males and 7 females), 20 patients with sickle cell-hemoglobin C disease (SC; 10 males and 10 females) and 16 patients with sickle cell anemia (SS; 8 males and 8 females).

Both SS and SC patients recruited are regularly followed by the Sickle Cell Unit of the Academic Hospital of Pointe-à-Pitre (Pointe-à-Pitre, Guadeloupe). All participants were over 18 yrs and were Afro-Caribbean native from Guadeloupe. SCD patients were in clinical steady state at the time of the study (*i.e.*, without vaso-occlusive crisis, acute medical complication or blood transfusion/phlebotomies within the last 3 months). Exclusion criteria for all subjects were recent infectious episode (in the last month), \Box -thalassemia, stroke or cerebral vasculopathy history, pregnancy or breast-feeding. Patients taking medication that could affect the hemorheological parameters studied, such as Hydroxyurea, were excluded. All participants received verbal and written explanation of the objectives and procedures of the study and subsequently provided written informed consent.

Protocol

For each participant, a physician from the Sickle Cell Unit (Guadeloupe) performed a clinical examination with transcutaneus oxygen saturation (SpO₂) and blood pressure measurements. The mean arterial pressure was calculated as follows: 1/3 systolic pressure + 2/3 diastolic

pressure. Venous blood was sampled in EDTA tubes from the antecubital vein of the nondominant arm to perform hematological and hemorheological (*i.e.*, blood viscosity, RBC deformability, RBC aggregation and disaggregation properties) measurements. Then, healthy subjects and SCD patients were placed in a normalized sitting position (thighs-trunk angle of 110° and forearm at heart level to avoid venous pooling of the blood) for 10 min prior the near-infrared spectroscopy (NIRS, NIRO-200, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) measurement. The experiment started with a 10-min muscle tissue oxygenation index (TOI) measurement at a sampling frequency of 6 Hz. At the end of this period, three consecutive venous occlusions (50 mmHg) of 30 seconds duration were applied to test microvascular forearm blood flow (mFBF) and muscle VO₂. One minute of recovery separated each occlusion. Then, subjects performed handgrip exercise test to assess the maximum voluntary contraction (MVC) and local muscle fatigability.

Near-infrared spectroscopy and determination of the muscle microvascular oxygenation (TOI), microvascular forearm blood flow (mFBF) and muscle oxygen consumption (VO₂)

NIRS techniques have been described elsewhere [16,17]. Briefly, NIRS principle is based on the relative transparency of tissue to light in the near-infrared region between 700 nm and 1000 nm, and on the oxygen-dependent absorption changes of hemoglobin. NIRS can be used in sickle cell patients since the near-infrared spectra absorbance of hemoglobin S is similar to the one of normal hemoglobin [18].

The relative concentration changes of oxygenated hemoglobin (Δ HbO₂), deoxygenated hemoglobin (Δ HHb), total hemoglobin (Δ cHb) and tissue oxyhemoglobin saturation expressed as a tissue oxygenation index (TOI) were measured continuously and

simultaneously throughout the experiment at the flexor digitorum superficialis muscle level using two channels of a three-wavelength (775 nm, 810 nm, 850 nm) high temporal resolution NIRS device (NIRO-200, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan). The center of the NIRS probes was placed on the flexor digitorum superficialis muscle at the proximal third of the forearm. The TOI is given by $[\Delta HbO_2 / (\Delta HHb + \Delta HbO_2)] \times 100$. The TOI value reflects the microvascular oxygen saturation at the local region of muscle between emission and detection probes. The two probes were firmly attached on the flexor digitorum superficialis muscle with an inter-probes distance of 4 cm by means of a medical adhesive (Hamamatsu Photonics, Massy, France) for measurement of TOI, mFBF and VO₂.

Forearm measurements

Adipose tissue thickness. Because adipose tissue thickness (*i.e.*, skin + adipose tissue thickness) is known to affect near infrared spectrometer signals such as oxygenated hemoglobin (Δ HbO₂), deoxygenated hemoglobin (Δ HHb) and total hemoglobin (Δ cHb), attention was taken to recruit subjects with comparable skinfold thickness [19]. Skinfold thickness was measured between the near infrared spectrometer optodes using a skinfold caliper (Harpenden, West Sussex, U.K) and was divided by 2 to determine the adipose tissue thickness covering the flexor digitorum superficialis muscle.

mFBF. The sum of Δ HbO₂ and Δ HHb reflects the total amount of hemoglobin (Δ cHb), and changes in Δ cHb can be interpreted as changes in blood volume in the tissue [20]. As previously described, mFBF was calculated by evaluating the rate of increase in Δ cHb during venous occlusion [20] within the first seconds of the 30 seconds occlusion. The mFBF was averaged on the data obtained during the three venous occlusions [20]. However, because the hemoglobin concentration is very different between AA, SC and SS groups, we normalized

mFBF by dividing the rate of increase in Δ cHb by the hemoglobin concentration for each participant. Normalized concentration changes of Δ cHb were expressed in $\Delta\mu$ mol cm dL min⁻¹.g⁻¹.

 VO_2 . Muscle VO₂ was determined by measuring the rate of increase in Δ HHb within the first seconds of the 30 seconds occlusion [20]. Concentration changes of Δ HHb were expressed in $\Delta\mu$ mol⁻cm⁻min⁻¹. Mean muscle VO₂ was averaged on the data obtained during the three venous occlusions. The venous occlusion method for muscle VO₂ measurements used in this study is less reliable than the arterial occlusion method [20]. However, since a short ischemia/hypoxia episode may promote the polymerization of hemoglobin S (HbS) and RBC sickling, hence increasing the risk for a painful vaso-occlusive crisis to occur, we used the venous occlusion method.

Muscle force and fatigability

To test muscle function, maximum voluntary contraction (MVC) force was determined by 3 consecutive MVC interspaced with one-minute recovery. The higher value was considered as being the MVC force (pre-MVC). After a recovery period of 5 min, the subject was asked to perform six intermittent isometric handgrip contraction (5 seconds at 50% MVC) followed by 5 seconds at rest. This protocol is adapted from Hamaoka and colleagues [21]. Ten seconds after the sixth isometric contraction, MVC force was re-determined once (post-MVC). To control the quality of MVC, the root mean square (RMS) obtained with surface electromyography (EMG) was used. The post-MCV was considered maximal only if the RMS of the post-MVC was equal or slightly higher than the RMS of the pre-MVC. This condition was fulfilled for 8 AA subjects, 7 SC and 8 SS patients and statistical analysis of local exercise data was performed on these subgroups.

Surface electromyography (EMG) activity

EMG from the flexor digitorum superficialis muscle was recorded by means of bipolar Ag/AgCl electrodes (Red DotTM, Saint Paul, Canada) with a diameter of 9 mm and an interelectrode distance of 20 mm. The electrodes were placed on the flexor digitorum superficialis muscle distally after the near infrared spectrometer probes. The reference electrode was placed on the patella. In order to minimize movement artifacts, electrodes and cables were strapped on the subjects using medical hypoallergenic tape. EMG activity was recorded continuously during the exercise cession via a dedicated acquisition system (MP30, Biopac Systems, Santa Barbara, CA, USA). The EMG signals were amplified (1000x), band-pass filtered (30-500 Hz) and sampled at 1000 Hz. The EMG signal amplitude was quantified by the calculation of the RMS. The RMS was calculated over a 1 second period around the maximal value for the MVC (Table 2).

Spectral analysis of muscle microvascular oxygenation variability

Muscle microvascular blood flow is variable across the time for a given subject and this variability reflects muscle microvascular flowmotion and vasomotion. In resting condition, the TOI variability mainly reflects blood flow variability since muscle oxygen consumption is constant over the time [22,23]. Muscle microcirculatory oxygenation exhibits spontaneous oscillations in five frequency components [22,23]. The Fast Fourier Transform (Welch's periodogram method) was applied on the TOI signal for the evaluation of the total power of the spectrum in the frequency interval 0.005-2 Hz (*i.e.*, total muscle microcirculatory oxygenation variability) and calculation of the power across 5 band frequencies. The upper limit of 2 Hz was set to include the heart rate frequency, while the lower limit was chosen to

include the three lowest frequencies intervals usually observed in tissue oxygenation signals [22,23,24]. It has been demonstrated that interval I (0.005-0.02 Hz) reflects nitric oxide metabolism and/or endothelial function [25,26,27], interval II (0.02-0.06 Hz) depends on the sympathetic activity of the vessel wall [23], and interval III (0.06-0.20 Hz) corresponds to the myogenic activity [26], For the high oscillatory activities, interval IV (0.20-0.6 Hz) depends on the breathing frequency and interval V (0.6-2 Hz) is under the influence of heart rate and cardiac output [22]. The whole oscillations recorded (*i.e.*, TOI variability or total power of the spectrum) reflect flowmotion. The flowmotion results from the motion of the blood cells and their interaction with the vessel walls. The low frequency domain (intervals I, II and III) corresponds to the vasomotion activity [22,23]. The power of each interval was also analyzed and expressed in percent contribution of the total power of TOI variability.

Hematological parameters

Hematocrit was measured after blood microcentrifugation at 9500 g for 10 min (JOUAN-HEMA-C, Saint Herblain, France). Total counts of leukocytes, platelets and RBCs, percentage of reticulocytes and hemoglobin concentration were determined using a hematology analyzer (Max M-Retic, Coulter, USA).
Hemorheological parameters measurement

Hemorheological parameters were measured within the four hours after sampling and after full re-oxygenation of blood for 10-15 min [28]. Blood viscosity was measured at $\approx 25^{\circ}$ C and native hematocrit using a cone-plate viscometer (Brookfield DVII+ with CPE40 spindle) at 225 s⁻¹. The RBC elongation index values were determined at 30 Pa by laser diffraction analysis (ecktacytometry) and at 37°C, using the Laser assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA, RR Mechatronics, Hoorn, The Netherlands). The system calculates an average RBC elongation index. The higher this index, the more deformable the RBCs. RBC aggregation was determined at 37°C via syllectometry (*i.e.*, laser backscatter versus time), using the LORCA (RR Mechtronics, Hoom, The Netherlands), after adjustment of hematocrit to 40%. The system calculates an aggregation index. The RBC disaggregation threshold (*i.e.*, the minimal shear rate needed to prevent RBC aggregation or to break down existing RBC aggregates) was determined using a re-iteration procedure [29]. The RBC disaggregation threshold mainly reflects the RBC aggregate strength while the RBC aggregation index is a measure of the extent of aggregation integrated during a time period of 2 minutes. Hemorheological measurements were performed according to the international guidelines for hemorheological laboratory techniques [28].

Statistics

All values were expressed as means \pm standard deviations. The data were tested for the normality (Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity of variance (Levene test). Physiological, hematological, hemorheological and muscle oxygenation parameters were compared between the three groups using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed

by a Newman-Keuls post-hoc test. When the rules for parametric test application were not fulfilled, a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison tests was used.

To identify factors associated with muscle VO₂ (*i.e.*, dependent variable) in AA, SC or SS subjects, we used parametric or non parametric correlations (Pearson or Spearman, respectively) between muscle VO₂ and the others physiological/biological parameters. Then all variables at p < 0.2 were included in a multivariate linear regression models to identify the covariates independently associated with muscle VO₂. The significance level was defined as p < 0.05. Analyses were conducted using SPSS (v. 20, IBM SPSS Statistics, Chicago, IL).

Results

Subjects' characteristics, hematological and hemorheological parameters

The subjects' characteristics, hematological and hemorheological parameters are summarized in the Table 1.

Age, mean arterial pressure and skin + adipose tissue thickness were not significantly different between the three groups. SpO_2 was lower in the SS group compared to both AA and SC groups.

Fetal hemoglobin level, leukocytes and percentage of reticulocytes were significantly higher in the SS group than in both SC and AA groups. RBC count was significantly lower in the SS group compared to the SC and AA groups. Hemoglobin and hematocrit were different between the three groups with AA > SC > SS. The platelets count was higher in the SS group than in the AA group and no difference was observed between SC patients and AA subjects or SS patients.

Blood viscosity was greater in the SC group than in the AA and SS groups. The SS and AA groups were not significantly different regarding blood viscosity. RBC elongation index was

significantly different between the three groups in the following order: SS < SC < AA. The RBC aggregation index was different between the three groups such as SC < SS < AA. The RBC disaggregation threshold was higher in the two SCD groups in comparison with AA subjects.

Muscle microvascular oxygenation (TOI), microvascular forearm blood flow (mFBF) and muscle oxygen consumption (VO₂)

The muscle TOI (Figure 1) was lower in SS group compared to both AA and SC groups and this was not related to the degree of hemorheological alterations as no significant correlation was found between muscle TOI and hemorheological parameters. mFBF was significantly higher in the SS group than in the AA group, and tended to be higher compared to the SC group (Figure 2a). No statistical difference was observed between the three groups for muscle VO₂ (Figure 2b).

Muscle TOI variability

The total muscle TOI variability (Figure 3a), the power spectral density for the intervals I, II, III representing vasomotion activity (Figure 3b) and the power spectral density for the intervals IV and V (Figure 3c) were not different between the groups. The relative contributions of intervals I, II, III and IV were not different between the three groups (Figure 3d). The relative contribution of the interval V characterizing the effect of cardiac output on TOI variability was increased in the SS group in comparison with AA and SC groups (SS > SC = AA) (Figure 3d). A representative example of Fast Fourier Transform analysis of the TOI signal variability in three subjects (1 AA, 1 SC and 1 SS patient) is shown on Figure 4.

Muscle VO₂ correlations and multivariate linear regression models

In the AA group, muscle VO₂ was negatively correlated with TOI (r = -0.7; p < 0.01) and adipose tissue thickness (r = -0.61; p = 0.01), positively correlated with vasomotion activity (*i.e.*, TOI variability of interval I + II + III; r = 0.69; p < 0.01) and tended to be positively correlated with hemoglobin concentration (r = 0.45; p = 0.08). No correlation was observed between muscle VO₂ and SpO₂, mFBF or hemorheological parameters in the AA group. To identify factors independently associated with muscle VO₂, a multivariate linear regression analysis was performed. The multivariate linear regression model included muscle VO₂ as dependent variable and hemoglobin concentration, TOI, adipose tissue thickness and vasomotion activity as covariates. The overall model was statistically significant ($R^2 = 0.64$; p = 0.015) and only TOI remained significantly associated with the muscle VO₂ (beta = -0.62; p = 0.045).

In the SC group, muscle VO₂ was positively correlated with mFBF (r= 0.77; p < 0.001) and vasomotion activity (r = 0.71; p < 0.001), negatively correlated with the RBC disaggregation threshold (r = -0.52; p < 0.05) and adipose tissue thickness (r = -0.741; p < 0.001), and tended to be negatively correlated with TOI (r = -0.43; p = 0.06). Because the p value was less than 0.20 between RBC aggregation index and muscle VO₂ (p = 0.16), RBC aggregation index was included in the multivariate linear regression analysis with TOI, mFBF, RBC disaggregation threshold, adipose tissue thickness and vasomotion activity as covariates, and muscle VO₂ as dependent variable. The overall model was highly statistically significant demonstrating that these variables together account for almost 90% of the variation in muscle VO₂ ($R^2 = 0.89$; p < 0.001). Among these variables, adipose tissue thickness (beta = -0.56; p =

0.01), mFBF (beta = 0.39; p = 0.03) and the RBC disaggregation threshold (beta = -0.55; p = 0.03) remained significantly and independently associated with the muscle VO₂.

For the SS group, we observed a positive correlation between VO₂ and mFBF (r = 0.67; p < 0.01). No correlation was observed between muscle VO₂ and the other parameters but both RBC elongation index (p = 0.11) and RBC aggregation index (p = 0.13) were included with mFBF as covariates in the multivariate linear regression model to test the independent association with muscle VO₂. The overall model was statistically significant (R² = 0.47; p = 0.048) and only mFBF remained significantly associated with the muscle VO₂ (beta = 0.73; p = 0.03).

Muscle force and fatigability

Muscle force and fatigability are summarized in the Table 2. The pre-MVC values were lower in SC and SS groups compared to the AA group. The post-MVC values were lower in the SS group compared to the AA group. Although the post-MVC values were not statistically different between the SC and AA groups, they tended to be lower in the SC patients (p =0.07). In each of the three groups pre-MVC values were significantly higher than post-MCV values. No difference was observed between the three groups for the RMS pre-MVC and post-MCV. Nevertheless, the two sickle cell groups tended to have a higher RMS pre-MVC than the AA group (p = 0.1). RMS pre-MVC and RMS post-MVC were not different. No difference was observed between the three groups for the percent of force decrease between pre-MVC and post-MCV.

Discussion

This is the first study investigating muscle microvascular metabolism in the sickle cell population. We demonstrated 1) normal muscle microvascular oxygenation in SC patients but reduced muscle microvascular oxygenation in SS patients when compared with AA control subjects; 2) no difference between AA, SC and SS subjects regarding muscle oxygen consumption or vasomotion activity despite the presence of hemorheological abnormalities in the sickle cell population; 3) muscle microvascular blood flow was significantly higher in the SS group compared to the AA group, and tended to be higher compared with SC patients; 4) a significant association between muscle oxygen consumption and muscle microvascular blood flow in SC and SS patients (and with the RBC disaggregation threshold in SC patients only), whereas muscle oxygen consumption is dependent on muscle microvascular oxygenation in AA control subjects. Local exercise challenge showed 1) a reduced forearm maximal voluntary contraction in SS and SC patients compared to the AA group; 2) similar force decrement after an intermittent handgrip exercise in the three groups.

Hemorheological parameters

The observed blood rheological abnormalities of SC and SS groups were in agreement with previous studies [30,31], with RBC deformability and aggregation being reduced and the RBC disaggregation threshold (*i.e.*, the strength to separate RBC aggregates) being abnormally elevated in the SCD patients in comparison with the control subjects. In non-SCD context, it has been demonstrated that hemorheological abnormalities may alter blood flow in macro- and microcirculation, as well as tissue oxygenation [10,32,33]. However, the present study showed that the reduction of muscle microvascular oxygenation in the SS group was not

associated with the degree of hemorheological alterations. Moreover, despite the presence of blood hyperviscosity in SC patients, this group had normal muscle microvascular oxygenation. These findings suggest that the muscle microvascular system at rest may adapt to compensate for the RBC rheological disorders and to provide enough oxygen to muscle tissue.

Methodological considerations and limitations

We found no correlation between adipose tissue thickness and muscle microvascular oxygenation and microvascular blood flow. In contrast, a significant correlation was found between adipose tissue thickness and muscle oxygen consumption in AA and SC groups but not in the SS group. Because adipose tissue thickness is a substantial confounder in the measurement of near-infrared parameters, muscle oxygen consumption could have been underestimated in the AA and SC groups. Nevertheless, in this experiment, attention was devoted to make the skinfold thickness very comparable between the three groups. The mean difference between the groups for adipose tissue thickness was 0.1-0.4 mm and was not significant. It was previously shown that the near-infrared light absorbance was decreased of 30 % when the thickness of the fat layer increased from 2.5 to 5 mm [19]. We believe that the small difference of adipose tissue thickness between our groups had a limited influence on the mean muscle oxygen consumption of AA and SC groups. Nevertheless, because the value of the adipose tissue thickness ranged from ~ 1.4 to 6.7 mm in each group, this parameter was considered in the multivariate linear regressions models to identify factors associated with the local muscle VO₂ within AA and SC groups. We reported that adipose tissue thickness remained independently associated with muscle oxygen consumption in the SC group, only.

Unfortunately, we were not able to normalize the muscle oxygen consumption by the muscle mass. It may be a limit of the study since a greater number of muscle cells will increase the value of resting muscle oxygen consumption. Nevertheless, it has been clearly demonstrated that SS patient have usually lower lean and fat mass than healthy subjects [34,35] because of an increased rate of protein turnover [35]. Badallo et al [36] suggested that this higher protein turnover rate could also occur at the muscle level in SS patients. A lower muscle mass in sickle cell patients could result in a greater muscle VO₂ in SS patients compared to the AA and SC groups. Nevertheless, it is also possible that NIRS signal could be poorly affected by muscle mass since only a limited proportion of the whole muscle size is analyzed: the spatial resolution of the NIRS signal is limited at approximately the half of the interprobes distance (*i.e.*, \sim 2 cm) [19]. The impact of muscle mass on muscle oxygen consumption measurement using NIRS device is probably not linear and specific designed protocols to address these issues are needed.

Muscle microvascular metabolism

Despite reduced muscle microvascular oxygenation (in SS group only) and hemorheological alterations, the muscle oxygen consumption in SC and SS patients was not different from the AA group. One may hypothesize that muscle oxygen extraction could be increased in SS patients. The reduced affinity of hemoglobin S for oxygen at low oxygen partial pressure [37] could facilitate the delivery of oxygen to the tissues, thus decreasing muscle microvascular oxygenation but maintaining muscle oxygen consumption to normal level. But, it could also be argued that the reduced affinity of hemoglobin S for oxygen could be offset by an impaired oxygen loading in the lung capillaries. However, although a significant amount of sickle cells [37], the

hemoglobin oxygen saturation of the SS group was only modestly decreased. In addition, no correlation between muscle oxygenation or muscle oxygen consumption and arterial hemoglobin oxygen saturation was observed in our study.

The reduction of the muscle microvascular oxygenation in SS patients could be at the origin of the increased muscle blood flow in this group since a decrease of the arterial oxygen content usually results in a rise of blood flow [38]. Ellsworth et al. suggested that RBCs are able to detect a reduction of the hemoglobin oxygen saturation and, in turn, release ATP into the circulation to cause vasodilation and increase blood flow [39]. In addition, one could suggest that the reduced microvascular oxygenation could lower the muscle oxygen consumption leading to an increased glycolytic end-products production, such as adenosine, causing the relaxation of vascular smooth muscle cells and vasodilation [40]. Indeed, the increased muscle microvascular blood flow in SS patients could serve to maintain muscle oxygen consumption to normal level. However, another mechanism can be proposed. The reduced microvascular oxygenation coupled with a normal resting muscle oxygen consumption could indicate that there is slight hypoxia within the muscle which is not sufficient to limit mitochondrial respiration (because of high affinity of cytochrome c oxidase for oxygen) [41]; and 2) the increased microvascular blood flow is a consequence of the slight hypoxia, which would serve to partially reverse the hypoxia, without affecting muscle oxygen consumption, because even moderate hypoxia does not limit resting respiration rate [41].

In the SC group, an independent association was also observed between muscle oxygen consumption and the RBC disaggregation threshold. The elevated RBC disaggregation threshold in SC patients may increase flow resistance at the entry of capillaries where RBCs

aggregates need to be fully dispersed before they can be able of entering into, and negotiate, small capillaries [32]. Indeed, high RBC disaggregation threshold could impair muscle perfusion and muscle oxygen consumption. The reasons why this association was observed in the SC group and not in the SS group, despite a comparable RBC disaggregation threshold in the two groups, are unknown. But, one may hypothesize that the higher microvascular blood flow observed in SS patients could break-down the existing RBC aggregates more easily than in SC patients, hence limiting the impact of the elevated RBC disaggregation threshold on the microcirculation of SS patients at the muscle level.

Although vasomotion was positively correlated with muscle oxygen consumption in SC patients (but not in SS patient), the multivariate linear regression failed to demonstrate an independent association between these two parameters. Vasomotion activity is known to be less pronounced in muscle than in other organs such as brain or kidneys where vasomotion is a key regulator of tissue perfusion [40]. Our results suggest that muscle microvascular blood flow is more effective than muscle vasomotion activity to maintain normal resting muscle oxygen consumption in sickle cell patients.

We did not address the role of the autonomic nervous system activity, and more particularly of the sympathetic activity, on the muscle blood flow regulation in this study. It is known that sickle cell patients (mainly SS patients) are characterized by an autonomic imbalance with a loss of heart rate variability [3,42]. Whether this autonomic imbalance impacts on the regulation of the baseline muscle blood flow in this population is unknown. Nevertheless, the results obtained with the spectral analysis of the NIRS signal demonstrates that interval II (figures 3b and 3d), which depends on the sympathetic activity of the vessel wall, did not differ between SS patients and the two other groups. Indeed, it is highly possible that local

vasodilatory substances released by muscles or RBCs have played a role in the positive regulation of muscle blood flow.

Muscle force and fatigability

The short and local handgrip exercise demonstrated a reduction of the maximal voluntary muscle force in SS and SC patients compared to AA group. This result is in accordance with the literature [43]. Although the RMS values of the pre-maximum voluntary contraction were not significantly different between the three groups, they tended to be lower in sickle cell patients compared to the control group (p = 0.1). RMS is an indicator of the spatial and temporal muscle fibers recruitment [44]. Therefore the reduction of the maximal voluntary muscle force in SS and SC patients may be attributable to a lower muscle mass or neural recruitment that could be due to strength deconditionning and physical inactivity. In contrast, the decrease of force after the intermittent handgrip exercise was not different between the three groups suggesting that local muscle fatigability is similar in patients and control subjects. The normal muscle metabolism and the normal or higher local microvascular blood flow observed in sickle cell patients probably participate in maintaining a normal muscle function during a local submaximal exercise. Nevertheless, the microvascular adaptations observed at rest could be of limited impact in SCD patients during longer or more intense physical efforts since the important cardio-respiratory work is not sufficient to compensate for the adverse effects of anemia on tissue oxygen delivery during intense exercise [9,30,45].

In conclusion, we demonstrated that sickle cell patients have normal baseline muscle oxygen consumption despite hemorheological alterations and that only SS patients had reduced muscle microvascular oxygenation and increased microvascular blood flow. The increased muscle microvascular blood flow in SS patients could be either a way to compensate for the reduced muscle microvascular oxygenation, hence maintaining muscle oxygen consumption to normal level or a consequence of a slight hypoxia within the muscle, which is not sufficient to limit the muscle oxygen consumption. Altogether, these results suggest that the limited maximal exercise capacity in sickle cell patients is rather due to chronic anemia, cardiorespiratory over-solicitation and/or physical inactivity than muscle metabolism alterations. However, further studies are needed to characterize muscle metabolism at exercise and in most severe patients.

Acknowledgments

The authors thank all the subjects who participated in the present study and the nurses (Mrs. Negrit, Mrs. Guyonnet and Mrs Bibrac) for technical assistance. We also thank Pr. Stephane Perrey from the Laboratory Motor Efficiency and Deficiency (University of Montpellier, France) for his grateful advices on NIRS device and Dr. Sophie Antoine (University of Antilles-Guyane) for useful discussion on EMG analysis.

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1. Kaul DK, Fabry ME (2004) In vivo studies of sickle red blood cells. Microcirculation 11: 153-165.
- 2. Lamarre Y, Romana M, Waltz X, Lalanne-Mistrih ML, Tressières B, et al. (In press) Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in sickle cell disease. Haematologia.
- 3. Nebor D, Bowers A, Hardy-Dessources MD, Knight-Madden J, Romana M, et al. (2011) Frequency of pain crises in sickle cell anemia and its relationship with the sympathovagal balance, blood viscosity and inflammation. Haematologica 96: 1589-1594.
- 4. Ballas SK, Smith ED (1992) Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis. Blood 79: 2154-2163.
- Connes P, Machado R, Hue O, Reid H (2011) Exercise limitation, exercise testing and exercise recommendations in sickle cell anemia. Clin Hemorheol Microcirc 49: 151-163.
- 6. Tavakkoli F, Nahavandi M, Wyche MQ, Castro O (2005) Effects of hydroxyurea treatment on cerebral oxygenation in adult patients with sickle cell disease: an open-label pilot study. Clin Ther 27: 1083-1088.
- 7. Raj A, Bertolone SJ, Mangold S, Edmonds HL, Jr. (2004) Assessment of cerebral tissue oxygenation in patients with sickle cell disease: effect of transfusion therapy. J Pediatr Hematol Oncol 26: 279-283.
- 8. Nahavandi M, Tavakkoli F, Hasan SP, Wyche MQ, Castro O (2004) Cerebral oximetry in patients with sickle cell disease. Eur J Clin Invest 34: 143-148.
- Callahan LA, Woods KF, Mensah GA, Ramsey LT, Barbeau P, et al. (2002) Cardiopulmonary responses to exercise in women with sickle cell anemia. Am J Respir Crit Care Med 165: 1309-1316.
- 10. Parthasarathi K, Lipowsky HH (1999) Capillary recruitment in response to tissue hypoxia and its dependence on red blood cell deformability. Am J Physiol 277: H2145-2157.
- Rodgers GP, Schechter AN, Noguchi CT, Klein HG, Nienhuis AW, et al. (1984) Periodic microcirculatory flow in patients with sickle-cell disease. N Engl J Med 311: 1534-1538.
- 12. Aalkjaer C, Boedtkjer D, Matchkov V (2011) Vasomotion what is currently thought? Acta Physiol (Oxf) 202: 253-269.
- 13. Thorn CE, Kyte H, Slaff DW, Shore AC (2011) An association between vasomotion and oxygen extraction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 301: H442-449.
- 14. Kislukhin VV (2010) Stochasticity of flow through microcirculation as a regulator of oxygen delivery. Theor Biol Med Model 7: 29.
- 15. Tsai AG, Intaglietta M (1993) Evidence of flowmotion induced changes in local tissue oxygenation. Int J Microcirc Clin Exp 12: 75-88.
- 16. Perrey S (2008) Non-invasive NIR spectroscopy of human brain function during exercise. Methods 45: 289-299.
- 17. Ferrari M, Mottola L, Quaresima V (2004) Principles, techniques, and limitations of near infrared spectroscopy. Can J Appl Physiol 29: 463-487.
- 18. Nahavandi M, Nichols JP, Hassan M, Gandjbakhche A, Kato GJ (2009) Near-infrared spectra absorbance of blood from sickle cell patients and normal individuals. Hematology 14: 46-48.

- 19. van Beekvelt MC, Borghuis MS, van Engelen BG, Wevers RA, Colier WN (2001) Adipose tissue thickness affects in vivo quantitative near-IR spectroscopy in human skeletal muscle. Clin Sci (Lond) 101: 21-28.
- 20. Van Beekvelt MC, Colier WN, Wevers RA, Van Engelen BG (2001) Performance of near-infrared spectroscopy in measuring local O(2) consumption and blood flow in skeletal muscle. J Appl Physiol 90: 511-519.
- 21. Hamaoka T, Katsumura T, Murase N, Sako T, Higuchi H, et al. (2003) Muscle oxygen consumption at onset of exercise by near infrared spectroscopy in humans. Adv Exp Med Biol 530: 475-483.
- 22. Li Z, Leung JY, Tam EW, Mak AF (2006) Wavelet analysis of skin blood oscillations in persons with spinal cord injury and able-bodied subjects. Arch Phys Med Rehabil 87: 1207-1212; quiz 1287.
- 23. Soderstrom T, Stefanovska A, Veber M, Svensson H (2003) Involvement of sympathetic nerve activity in skin blood flow oscillations in humans. Am J Physiol Heart Circ Physiol 284: H1638-1646.
- 24. Rossi M, Carpi A, Galetta F, Franzoni F, Santoro G (2006) The investigation of skin blood flowmotion: a new approach to study the microcirculatory impairment in vascular diseases? Biomed Pharmacother 60: 437-442.
- 25. Kvandal P, Stefanovska A, Veber M, Kvernmo HD, Kirkeboen KA (2003) Regulation of human cutaneous circulation evaluated by laser Doppler flowmetry, iontophoresis, and spectral analysis: importance of nitric oxide and prostaglandines. Microvasc Res 65: 160-171.
- 26. Stefanovska A, Bracic M, Kvernmo HD (1999) Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique. IEEE Trans Biomed Eng 46: 1230-1239.
- 27. Kvernmo HD, Stefanovska A, Kirkeboen KA, Kvernebo K (1999) Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators. Microvasc Res 57: 298-309.
- 28. Baskurt OK, Boynard M, Cokelet GC, Connes P, Cooke BM, et al. (2009) New guidelines for hemorheological laboratory techniques. Clin Hemorheol Microcirc 42: 75-97.
- 29. Hardeman MR, Dobbe JG, Ince C (2001) The Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer. Clin Hemorheol Microcirc 25: 1-11.
- 30. Waltz X, Hedreville M, Sinnapah S, Lamarre Y, Soter V, et al. (In press) Delayed beneficial effect of acute exercise on red blood cell aggregate strength in patients with sickle cell anemia. Clin Hemorheol Microcirc.
- 31. Tripette J, Alexy T, Hardy-Dessources MD, Mougenel D, Beltan E, et al. (2009) 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 94: 1060-1065.
- 32. Baskurt OK, Meiselman HJ (2008) RBC aggregation: more important than RBC adhesion to endothelial cells as a determinant of in vivo blood flow in health and disease. Microcirculation 15: 585-590.
- 33. Baskurt OK, Meiselman HJ (2007) Hemodynamic effects of red blood cell aggregation. Indian J Exp Biol 45: 25-31.
- Buison AM, Kawchak DA, Schall JI, Ohene-Frempong K, Stallings VA, et al. (2005) Bone area and bone mineral content deficits in children with sickle cell disease. Pediatrics 116: 943-949.

- 35. Buchowski MS, de la Fuente FA, Flakoll PJ, Chen KY, Turner EA (2001) Increased bone turnover is associated with protein and energy metabolism in adolescents with sickle cell anemia. Am J Physiol Endocrinol Metab 280: E518-527.
- 36. Badaloo A, Jackson AA, Jahoor F (1989) Whole body protein turnover and resting metabolic rate in homozygous sickle cell disease. Clin Sci (Lond) 77: 93-97.
- Seakins M, Gibbs WN, Milner PF, Bertles JF (1973) Erythrocyte Hb-S concentration. An important factor in the low oxygen affinity of blood in sickle cell anemia. J Clin Invest 52: 422-432.
- 38. Brown MM, Wade JP, Marshall J (1985) Fundamental importance of arterial oxygen content in the regulation of cerebral blood flow in man. Brain 108 (Pt 1): 81-93.
- Ellsworth ML, Ellis CG, Goldman D, Stephenson AH, Dietrich HH, et al. (2009) Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone. Physiology (Bethesda) 24: 107-116.
- 40. Pittman RN (2011) Regulation of tissue oxygenation. In: sciences MCl, editor. Integrated systems physiology: from molecule to function to disease. 2011/06/03 ed. San Rafael (CA).
- 41. Waypa GB, Schumacker PT (2010) Hypoxia-induced changes in pulmonary and systemic vascular resistance: where is the O2 sensor? Respir Physiol Neurobiol 174: 201-211.
- 42. Connes P, Coates TD (In press) Autonomic nervous system dysfunction: implication in sickle cell disease. C R Biol.
- 43. Dougherty KA, Schall JI, Rovner AJ, Stallings VA, Zemel BS (2011) Attenuated maximal muscle strength and peak power in children with sickle cell disease. J Pediatr Hematol Oncol 33: 93-97.
- 44. De Luca CJ (1997) The use of surface electromyography in biomechanics. J Appl Biomech 13: 135-163.
- 45. Balayssac-Siransy E, Connes P, Tuo N, Danho C, Diaw M, et al. (2011) Mild haemorheological changes induced by a moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia. Br J Haematol 154: 398-407.

Figure Legends

Fig 1. Muscle microvascular oxygen saturation (TOI) at rest in AA, SC and SS groups. Different from AA group (*p < 0.05); different from SC group (*p < 0.05).



Fig 2. Forearm blood flow at rest (2a) and muscle oxygen consumption at rest (2b) in AA, SC and SS groups.



Fig 3. Fast Fourier Transform analysis of TOI signal variability. Total power spectral density (3a, flowmotion activity), power spectral density in interval I, II and III (3b, vasomotion activity), power spectral density in interval IV, V (3c) and normalized spectral density (3d). Interval I = endothelial activity and/or nitric oxide metabolism, interval II = nervous sympathetic activity of the vessel wall, interval III = myogenic activity, interval IV = breathing frequency and interval V heart rate and cardiac output.



Fig 4. Example of Fast Fourier Transform analysis of TOI signal variability in one AA subject (left), one SC patient (middle) and one SS patient (right). The frequency axis is divided into three parts: vasomotion activity (left), interval IV (middle), and interval V (right). Note that the scale of the Y-axis is different for the three subjects.



Table 1. Subjects characteristics, hematological and hemorheological parameters in healthy

 subjects (AA) and patients with sickle cell-hemoglobin C disease (SC) or sickle cell anemia

 (SS)

	AA	SC	SS
Age (yrs)	34.6 ± 12.5	35.5 ± 12.3	32.9 ± 13.5
MAP (mmHg)	90.8 ± 9.2	88.9 ± 11.9	84.8 ± 8.3
SpO ₂ (%)	99.6 ± 0.7	99.2 ± 1.0	$95.8 \pm 3.0^{\dagger *}$
SATT (mm)	3.2 ± 1.0	3.1 ± 1.3	2.8 ± 1.4
Fetal hemoglobin (%)	0.4 ± 0.6	1.2 ± 0.8	$6.8\pm5.6^{*\dagger}$
Hemoglobin S (%)	-	47.4 ± 0.9	$83.8 \pm 6.1^*$
Hemoglobin C (%)	-	43.4 ± 1.3	-
Leukocytes (10 ⁹ /L)	6.3 ± 2.1	7.4 ± 2.5	$11.3 \pm 3.2^{*\dagger}$
Red blood cells (10 ¹² /L)	4.60 ± 0.52	4.35 ± 0.80	$2.88\pm0.43^{*\dagger}$
Hemoglobin (g/dL)	13.5 ± 1.3	$11.1 \pm 1.2^{*}$	$8.4\pm1.1^{*\dagger}$
Hematocrit (%)	42.0 ± 3.4	$32.5 \pm 2.8^{*}$	$24.9 \pm 4.3^{*\dagger}$
Reticulocytes (%)	1.1 ± 0.5	2.5 ± 1.6	$8.4\pm3.3^{*\dagger}$
Platelets count (10 ⁹ /L)	248 ± 58	311 ± 171	$403 \pm 119^{*}$
ηb at 225s ⁻¹ (mPa/s)	6.3 ± 1.0	$7.9 \pm 1.2^{*}$	$6.3 \pm 1.6^{\dagger}$
EI at 30 Pa	0.59 ± 0.02	$0.43\pm0.05^*$	$0.34 \pm 0.12^{*\dagger}$
RBC aggregation index (%)	64.6 ± 7.2	$43.2 \pm 9.4^{*}$	$52.5 \pm 10.6^{*\dagger}$
RBC disaggregation threshold (s ⁻¹)	146 ± 43	$295 \pm 128^*$	$394 \pm 172^{*}$

Values represent mean \pm S.D. MAP = mean arterial pressure, SpO₂ = transcutaneus oxygen saturation, SATT = skin + adipose tissue thickness, ηb = blood viscosity, EI = Elongation Index (*i.e.*, RBC deformability). Different from AA (*p < 0.05); different from SC (†p < 0.05).

	AA	SC	SS
n (M/F)	8 (3/5)	7 (3/4)	8 (3/5)
Pre-MVC (Kg)	18.2 ± 3.0	$14.9 \pm 3.5*$	$13.2 \pm 2.5*$
RMS pre-MVC (mV)	0.60 ± 0.26	0.46 ± 0.10	0.35 ± 0.10
Post-MVC (Kg)	14.4 ± 3.0†	12.0 ± 2.3†	11.1 ± 1.8*†
RMS post-MVC (mV)	0.64 ± 0.30	0.46 ± 0.10	0.39 ± 0.10
Force decrease (%)	22.0 ± 6.0	18.4 ± 4.4	17.2 ± 7.7

Table 2. Muscle force and fatigability (*i.e.*, force decrease) in healthy subjects (AA) and patients with sickle cell-hemoglobin C disease (SC) patients or sickle cell anemia (SS).

Values represent mean \pm S.D. n (M/F) = sample size (male/female), pre-MVC = maximal voluntary contraction before isometric handgrip exercise, post-MVC = maximal voluntary contraction after isometric handgrip exercise, force decrease = percentage of maximal voluntary contraction decrease after exercise, RMS = root mean square. Post-MVC of SC patients tended to be lower than AA subjects (p = 0.07). Different from AA group (*p < 0.05); different from pre-MVC (*p < 0.05).

XI. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES DE CETTE THESE

XI.1 CONCLUSION GENERALE

Les recherches conduites dans le cadre de cette thèse ont montré qu'un exercice, de courte durée et dont l'intensité ne dépasse par le premier seuil ventilatoire, n'exacerbe pas les altérations hématologiques et hémorhéologiques chez les patients drépanocytaires de génotype SS. Cette modalité de pratique semble même avoir un effet bénéfique, en diminuant le seuil de désagrégation érythrocytaire, dans la phase de récupération à 36 et 60 heures après l'effort. En effet, notre équipe à montré récemment que le seuil de désagrégation était associé à la survenue de syndrome thoracique aigu dans une population pédiatrique de patients drépanocytaires SC et SS (220). Néanmoins, nous avons observé le cas d'un patient qui a connu une hypoxémie artérielle induite par l'exercice (HIE) importante. Ainsi, une durée d'exercice plus importante, que les 12-15 minutes proposées dans l'étude n°1 aurait pu conduire à des complications cliniques.

Ce constat nous a conduit à étudier, dans une seconde étude, les causes de l'hypoxémie artérielle au repos et à l'HIE. Nous avons montré que l'hypoxémie artérielle de repos était associée au niveau d'hémolyse et tendait à être associée à une déformabilité érythrocytaire réduite. D'autre part, l'HIE était associée à un pourcentage de la distance prédite plus importante, à un seuil de désagrégation élevé et aux antécédents cliniques de syndrome thoracique aigu. L'association entre l'HIE et le pourcentage de la distance prédite suggère que l'intensité de l'exercice est un facteur de risque d'HIE. Par ailleurs, de manière surprenante, un seuil de désagrégation élevé semble être un facteur de risque d'HIE et dans le même temps un exercice aigu conduit à une diminution de ce seuil de désagrégation érythrocytaire durant la phase de récupération. L'activité physique, pour le patient drépanocytaire, pourrait donc être à la fois un facteur de risque et un moyen thérapeutique pour atténuer les altérations hémorhéologiques. Par ailleurs, les études n°3 et 4, ont montré que les altérations hémorhéologiques (*c.-à.d.* déformabilité érythrocytaire réduite et agrégation érythrocytaire réduite) semblent impliquées dans la réduction de la saturation en oxygène de la microcirculation au niveau cérébral (étude n°3) mais pas au niveau musculaire (étude n°4).

En outre, les deux études suggèrent que les altérations hématologiques et hémorhéologiques des patients drépanocytaires n'impactent pas directement l'oxygénation tissulaire au repos. Ce constat semble expliqué par l'existence de phénomène de compensation hémodynamique tel qu'une augmentation de l'activité vasomotion au niveau cérébral (étude n°3) ou encore une augmentation du débit sanguin dans la microcirculation musculaire (étude n°4). Il est probable que l'augmentation du débit sanguin de la microcirculation cérébrale puisse également être impliquée pour compenser la réduction de la saturation en oxygène dans la microcirculation. Cependant, ce paramètre n'a pas été mesuré dans l'étude n°3. Il est également à noter que le phénomène de vasomotion ne semble pas jouer de rôle majeur au niveau de la microcirculation musculaire et montre, comme le suggère Baskurt et collaborateurs, que chaque lit vasculaire possède ses propres caractéristiques hémodynamiques (34). Enfin, l'étude n°4 suggère que la perfusion musculaire en oxygène n'est pas un facteur limitant pour un exercice de courte durée et d'intensité modérée. Cependant, le test de handgrip utilisé dans l'étude n°4 rend compte de la fatigabilité musculaire et non des capacités aérobies des patients drépanocytaires. Pour cette, raison, il serait intéréressant de tester la consommation musculaire d'oxygène, chez les patients drépanocytaires, durant un exercice continu (sur ergocycle par exemple).

XI.2 PERSPECTIVES

Cette thèse fait ressortir plusieurs perspectives intéressantes :

- Elle encourage fortement la réalisation d'un protocole d'entraînement reposant sur des exercices de courtes durées et dont l'intensité ne dépasse pas le premier seuil ventilatoire. Ce type d'exercice devrait permettre une amélioration des paramètres hémorhéologiques qui sont au centre des complications cliniques que connaissent les patients drépanocytaires. Les paramètres hémorhéologiques qui pourraient en être positivement affectés sont le seuil de désagrégation érythrocytaire (étude n°1) et peut-être la déformabilité érythrocytaire qui semble être améliorée par l'entraînement chez l'animal (425). Au vu des liens entre la déformabilité érythrocytaire, l'oxygénation de la microcirculation cérébrale et le vasomotion cérébral observées dans l'étude n°3, il serait intéressant d'observer l'évolution de l'oxygénation de la microcirculation cérébrale et du vasomotion cérébral au cours de ce protocole d'entraînement.
- D'autre part, les résultats de l'étude n°3 encouragent la réalisation d'un protocole clinique longitudinal pour étudier l'évolution du vasomotion et observer si son augmentation est un facteur prédictif de la survenue de complications cérébrales. Quinn et collaborateurs ont montré récemment que des différences de saturation de l'hémoglobine en oxygène entre les deux hémisphères cérébraux peuvent exister (322). C'est pourquoi cette étude devra mesurer la saturation de l'hémoglobine en oxygène simultanément au niveau des deux hémisphères.
- Il a été montré par Sangkatumvong et collaborateurs qu'un stress hypoxique transitoire conduit à une diminution de l'activité parasympathique chez les patients drépanocytaires et non chez un groupe contrôle (342). Par ailleurs, Nebor et collaborateurs ont montré que les individus qui ont le système nerveux autonome le

plus altéré sont également ceux qui connaissent le plus de crises-vaso-occlusives (270). Or l'hypoxie est un régulateur majeur de l'activité du système nerveux autonome. Il serait donc intéressant d'observer si les patients drépanocytaires ayant la saturation en oxygène dans la microcirculation cérébrale la plus basse ne sont pas ceux qui ont également les plus fortes altérations de l'activité du système nerveux autonome et qui connaissent le plus de crises vaso-occlusives. Dans ce sens, une mesure simultanée des variations de l'oxygénation de la microcirculation cérébrale, de l'activité du système nerveux autonome et de la vasomotricité périphérique permettrait au mieux de rendre compte des liens entre oxygénation cérébrale, activité du système nerveux autonome et vasomotricité périphérique.

Dans l'étude n°4, nous avons observé qu'il existait une grande variabilité de VO₂ musculaire au sein du groupe de patients SS. Il serait intéressant de vérifier à l'aide de biopsies musculaires si la variabilité importante de la VO₂ musculaire peut s'expliquer par une variabilité importante du fonctionnement mitochondrial. Dans cette expérimentation, il s'agirait de tester si les patients avec la plus faible VO₂ musculaire ont également des valeurs de respiration mitochondriale (mesurées à l'aide de la technique sur fibre perméabilisée à la saponine) inférieures à ceux qui ont une VO₂ musculaire plus importante. D'autre part, afin de tester s'il s'agit d'une véritable dysfonction mitochondriale (et pas seulement d'une réduction du nombre de mitochondries) il faudrait normaliser les valeurs en les divisant par l'activité de la citrate synthase qui aurait été préalablement mesurée.

D. REFERENCES

- http://romius.free.fr/histologie/cri-cirs-wnts.univlyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/Respiratoire/res11rd.html.
- 2. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 111-117, 2002.
- 3. **Aalkjaer C, Boedtkjer D, and Matchkov V**. Vasomotion what is currently thought? *Acta Physiol (Oxf)* 202: 253-269, 2011.
- 4. **Abdu A, Gomez-Marquez J, and Aldrich TK**. The oxygen affinity of sickle hemoglobin. *Respir Physiol Neurobiol* 161: 92-94, 2008.
- Adams R, McKie V, Nichols F, Carl E, Zhang DL, McKie K, Figueroa R, Litaker M, Thompson W, and Hess D. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med* 326: 605-610, 1992.
- 6. Adams RJ, and Brambilla D. Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med* 353: 2769-2778, 2005.
- Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, Abboud M, Gallagher D, Kutlar A, Nichols FT, Bonds DR, and Brambilla D. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med* 339: 5-11, 1998.
- 8. Alcorn R, Bowser B, Henley EJ, and Holloway V. Fluidotherapy and exercise in the management of sickle cell anemia. A clinical report. *Phys Ther* 64: 1520-1522, 1984.
- 9. Allison AC. Notes on sickle-cell polymorphism. Ann Hum Genet 19: 39-51, 1954.
- 10. Alpert BS, Dover EV, Strong WB, and Covitz W. Longitudinal exercise hemodynamics in children with sickle cell anemia. *Am J Dis Child* 138: 1021-1024, 1984.
- 11. Angastiniotis M, Modell B, Englezos P, and Boulyjenkov V. Prevention and control of haemoglobinopathies. *Bull World Health Organ* 73: 375-386, 1995.
- 12. **Anselme F, Caillaud C, Couret I, Rossi M, and Prefaut C**. Histamine and exerciseinduced hypoxemia in highly trained athletes. *J Appl Physiol* 76: 127-132, 1994.
- 13. Anthi A, Machado RF, Jison ML, Taveira-Dasilva AM, Rubin LJ, Hunter L, Hunter CJ, Coles W, Nichols J, Avila NA, Sachdev V, Chen CC, and Gladwin MT. Hemodynamic and functional assessment of patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 1272-1279, 2007.

- 14. **Antonucci R, Walker R, Herion J, and Orringer E**. Enhancement of sickle erythrocyte adherence to endothelium by autologous platelets. *Am J Hematol* 34: 44-48, 1990.
- Armstrong FD, Thompson RJ, Jr., Wang W, Zimmerman R, Pegelow CH, Miller S, Moser F, Bello J, Hurtig A, and Vass K. Cognitive functioning and brain magnetic resonance imaging in children with sickle Cell disease. Neuropsychology Committee of the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Pediatrics* 97: 864-870, 1996.
- 16. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, and Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468: 232-243, 2010.
- Awodu OA, Famodu AA, Ajayi OI, Enosolease ME, Olufemi OY, and Olayemi E. Using serial haemorheological parameters to assess clinical status in sickle cell anaemia patients in vaso-occlussive crisis. *Clin Hemorheol Microcirc* 41: 143-148, 2009.
- Bachofen H, Schurch S, Urbinelli M, and Weibel ER. Relations among alveolar surface tension, surface area, volume, and recoil pressure. *J Appl Physiol* 62: 1878-1887, 1987.
- 19. **Bagge U**. Leukocytes and capillary perfusion in shock. In: *White Cell Mechanics: Basic Science and Clinical Aspects*, edited by Alan RL. New York: 1984, p. 285-294.
- 20. Balayssac-Siransy E, Connes P, Tuo N, Danho C, Diaw M, Sanogo I, Hardy-Dessources MD, Samb A, Ballas SK, and Bogui P. Mild haemorheological changes induced by a moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 154: 398-407, 2011.
- 21. Balkaran B, Char G, Morris JS, Thomas PW, Serjeant BE, and Serjeant GR. Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease. *J Pediatr* 120: 360-366, 1992.
- 22. Ballas SK, Lewis CN, Noone AM, Krasnow SH, Kamarulzaman E, and Burka ER. Clinical, hematological, and biochemical features of Hb SC disease. *Am J Hematol* 13: 37-51, 1982.
- 23. **Ballas SK, and Smith ED**. Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis. *Blood* 79: 2154-2163, 1992.
- 24. Barabino GA, Platt MO, and Kaul DK. Sickle cell biomechanics. *Annu Rev Biomed Eng* 12: 345-367, 2010.
- 25. Barbeau P, Woods KF, Ramsey LT, Litaker MS, Pollock DM, Pollock JS, Callahan LA, Kutlar A, Mensah GA, and Gutin B. Exercise in sickle cell anemia: effect on inflammatory and vasoactive mediators. *Endothelium* 8: 147-155, 2001.

- 26. Barnett J, Chow J, Ives D, Chiou M, Mackenzie R, Osen E, Nguyen B, Tsing S, Bach C, Freire J, and et al. Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochim Biophys Acta* 1209: 130-139, 1994.
- 27. Bartolucci P, Brugnara C, Teixeira-Pinto A, Pissard S, Moradkhani K, Jouault H, and Galacteros F. Erythrocyte density in sickle cell syndromes is associated with specific clinical manifestations and hemolysis. *Blood* 2012.
- Baskurt OK. Pathophysiological significance of blood rheology. *Turk J Med Sci* 33: 347-355, 2003.
- 29. Baskurt OK, Boynard M, Cokelet GC, Connes P, Cooke BM, Forconi S, Liao F, Hardeman MR, Jung F, Meiselman HJ, Nash G, Nemeth N, Neu B, Sandhagen B, Shin S, Thurston G, and Wautier JL. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clin Hemorheol Microcirc* 42: 75-97, 2009.
- Baskurt OK, Hardeman MR, Uyuklu M, Ulker P, Cengiz M, Nemeth N, Shin S, Alexy T, and Meiselman HJ. Comparison of three commercially available ektacytometers with different shearing geometries. *Biorheology* 46: 251-264, 2009.
- Baskurt OK, Levi E, Caglayan S, Dikmenoglu N, Ucer O, Guner R, and Yorukan
 S. The role of hemorheological factors in the coronary circulation. *Clin Hemorheol* 11: 121-127, 1991.
- 32. **Baskurt OK, and Meiselman HJ**. Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost* 29: 435-450, 2003.
- 33. **Baskurt OK, and Meiselman HJ**. Hemodynamic effects of red blood cell aggregation. *Indian J Exp Biol* 45: 25-31, 2007.
- Baskurt OK, and Meiselman HJ. In vivo hemorheology. In: Handbook of Hemorheology and Hemodynamics, edited by Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, and Meiselman HJ. Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington DC: IOS Press, 2007, p. 322-338.
- 35. **Baskurt OK, and 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* 15: 585-590, 2008.
- 36. **Baskurt OK, Ulker P, and Meiselman HJ**. Nitric oxide, erythrocytes and exercise. *Clin Hemorheol Microcirc* 49: 175-181, 2011.
- 37. **Baskurt OK, Yalcin O, and Meiselman HJ**. Hemorheology and vascular control mechanisms. *Clin Hemorheol Microcirc* 30: 169-178, 2004.

- 38. **Baumbach GL, Walmsley JG, and Hart MN**. Composition and mechanics of cerebral arterioles in hypertensive rats. *Am J Pathol* 133: 464-471, 1988.
- Baumler H, Donath E, Krabi A, Knippel W, Budde A, and Kiesewetter H. Electrophoresis of human red blood cells and platelets. Evidence for depletion of dextran. *Biorheology* 33: 333-351, 1996.
- 40. **Bayliss WM**. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol* 28: 220-231, 1902.
- 41. **Bernaudin F, and Verlhac S**. Accidents vasculaires cérébraux des drépanocytaires : apport du Doppler transcrânien et de l'imagerie en résonance magnétique. *Hématologie* 14: 25-35, 2008.
- 42. Bernaudin F, Verlhac S, Arnaud C, Kamdem A, Chevret S, Hau I, Coic L, Leveille E, Lemarchand E, Lesprit E, Abadie I, Medejel N, Madhi F, Lemerle S, Biscardi S, Bardakdjian J, Galacteros F, Torres M, Kuentz M, Ferry C, Socie G, Reinert P, and Delacourt C. Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. *Blood* 117: 1130-1140; quiz 1436, 2011.
- 43. Bernaudin F, Verlhac S, Coic L, Lesprit E, Brugieres P, and Reinert P. Long-term follow-up of pediatric sickle cell disease patients with abnormal high velocities on transcranial Doppler. *Pediatr Radiol* 35: 242-248, 2005.
- 44. Bernaudin F, Verlhac S, Freard F, Roudot-Thoraval F, Benkerrou M, Thuret I, Mardini R, Vannier JP, Ploix E, Romero M, Casse-Perrot C, Helly M, Gillard E, Sebag G, Kchouk H, Pracros JP, Finck B, Dacher JN, Ickowicz V, Raybaud C, Poncet M, Lesprit E, Reinert PH, and Brugieres P. Multicenter prospective study of children with sickle cell disease: radiographic and psychometric correlation. *J Child Neurol* 15: 333-343, 2000.
- 45. **Bertles JF, and Dobler J**. Reversible and irreversible sickling: a distinction by electron microscopy. *Blood* 33: 884-898, 1969.
- 46. **Bertles JF, and Milner PF**. Irreversibly sickled erythrocytes: a consequence of the heterogeneous distribution of hemoglobin types in sickle-cell anemia. *J Clin Invest* 47: 1731-1741, 1968.
- Bingisser RM, Joos L, Fruhauf B, Caravatti M, Knoblauch A, and Villiger PM. Pulmonary rehabilitation in outpatients with asthma or chronic obstructive lung disease. A pilot study of a "modular" rehabilitation programme. *Swiss Med Wkly* 131: 407-411, 2001.

- 48. **Bishop JJ, Popel AS, Intaglietta M, and Johnson PC**. Effects of erythrocyte aggregation and venous network geometry on red blood cell axial migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H939-950, 2001.
- 49. Blaisdell CJ, Goodman S, Clark K, Casella JF, and Loughlin GM. Pulse oximetry is a poor predictor of hypoxemia in stable children with sickle cell disease. *Arch Pediatr Adolesc Med* 154: 900-903, 2000.
- 50. Blann AD, Marwah S, Serjeant G, Bareford D, and Wright J. Platelet activation and endothelial cell dysfunction in sickle cell disease is unrelated to reduced antioxidant capacity. *Blood Coagul Fibrinolysis* 14: 255-259, 2003.
- 51. **Bollinger A, Hoffmann U, and Franzeck UK**. Evaluation of flux motion in man by the laser Doppler technique. *Blood Vessels* 28 Suppl 1: 21-26, 1991.
- 52. Bouix D, Peyreigne C, Raynaud E, Monnier JF, Micallef JP, and Brun JF. Relationships among body composition, hemorheology and exercise performance in rugbymen. *Clin Hemorheol Microcirc* 19: 245-254, 1998.
- 53. **Bouskela E, and Grampp W**. Spontaneous vasomotion in hamster cheek pouch arterioles in varying experimental conditions. *Am J Physiol* 262: H478-485, 1992.
- 54. Briceno JC, Cabrales P, Tsai AG, and Intaglietta M. Radial displacement of red blood cells during hemodilution and the effect on arteriolar oxygen profile. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1223-1228, 2004.
- 55. **Bridgers WH**. Cerebral vascular disease accompanying sickle cell anemia. *Am J Pathol* 15: 353-362 355, 1939.
- 56. Brittain HA, Eckman JR, Swerlick RA, Howard RJ, and Wick TM. Thrombospondin from activated platelets promotes sickle erythrocyte adherence to human microvascular endothelium under physiologic flow: a potential role for platelet activation in sickle cell vaso-occlusion. *Blood* 81: 2137-2143, 1993.
- 57. **Brown MM, Wade JP, and Marshall J**. Fundamental importance of arterial oxygen content in the regulation of cerebral blood flow in man. *Brain* 108 (Pt 1): 81-93, 1985.
- 58. **Brugnara C, Bunn HF, and Tosteson DC**. Regulation of erythrocyte cation and water content in sickle cell anemia. *Science* 232: 388-390, 1986.
- 59. **Brun JF, Khaled S, Raynaud E, Bouix D, Micallef JP, and Orsetti A**. The triphasic effects of exercise on blood rheology: which relevance to physiology and pathophysiology? *Clin Hemorheol Microcirc* 19: 89-104, 1998.
- 60. **Brun JF, Supparo C, Rama D, Benezis C, and Orsetti A**. Maximal oxygen uptake and lactate thresholds during exercise are related to blood viscosity and erythrocyte aggregation in professional football players. *Clin Hemorheol* 15: 201-212, 1995.

- 61. **Brun JF, Varlet-Marie E, Connes P, and Aloulou I**. Hemorheological alterations related to training and overtraining. *Biorheology* 47: 95-115, 2010.
- 62. Busija DW, Bari F, Domoki F, and Louis T. Mechanisms involved in the cerebrovascular dilator effects of N-methyl-d-aspartate in cerebral cortex. *Brain Res Rev* 56: 89-100, 2007.
- 63. **Busija DW, and Heistad DD**. Factors involved in the physiological regulation of the cerebral circulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 101: 161-211, 1984.
- 64. **Butler AR, Megson IL, and Wright PG**. Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in the vasculature. *Biochim Biophys Acta* 1425: 168-176, 1998.
- Cabel M, Meiselman HJ, Popel AS, and Johnson PC. Contribution of red blood cell aggregation to venous vascular resistance in skeletal muscle. *Am J Physiol* 272: H1020-1032, 1997.
- 66. **Cabrales P, and Tsai AG**. Plasma viscosity regulates systemic and microvascular perfusion during acute extreme anemic conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H2445-2452, 2006.
- 67. Cabrera G, Cot M, Migot-Nabias F, Kremsner PG, Deloron P, and Luty AJ. The sickle cell trait is associated with enhanced immunoglobulin G antibody responses to Plasmodium falciparum variant surface antigens. *J Infect Dis* 191: 1631-1638, 2005.
- Caesar K, Hashemi P, Douhou A, Bonvento G, Boutelle MG, Walls AB, and Lauritzen M. Glutamate receptor-dependent increments in lactate, glucose and oxygen metabolism evoked in rat cerebellum in vivo. *J Physiol* 586: 1337-1349, 2008.
- 69. Caillaud C, Anselme F, Mercier J, and Prefaut C. Pulmonary gas exchange and breathing pattern during and after exercise in highly trained athletes. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 67: 431-437, 1993.
- Caillaud C, Serre-Cousine O, Anselme F, Capdevilla X, and Prefaut C. Computerized tomography and pulmonary diffusing capacity in highly trained athletes after performing a triathlon. *J Appl Physiol* 79: 1226-1232, 1995.
- 71. Callahan LA, Woods KF, Mensah GA, Ramsey LT, Barbeau P, and Gutin B. Cardiopulmonary responses to exercise in women with sickle cell anemia. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 1309-1316, 2002.
- 72. Campbell A, Minniti CP, Nouraie M, Arteta M, Rana S, Onyekwere O, Sable C, Ensing G, Dham N, Luchtman-Jones L, Kato GJ, Gladwin MT, Castro OL, and Gordeuk VR. Prospective evaluation of haemoglobin oxygen saturation at rest and after exercise in paediatric sickle cell disease patients. *Br J Haematol* 147: 352-359, 2009.

- 73. **Carvalho H, and Pittman RN**. Longitudinal and radial gradients of PO(2) in the hamster cheek pouch microcirculation. *Microcirculation* 15: 215-224, 2008.
- 74. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P, Vera JC, and Levy PS. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 84: 643-649, 1994.
- 75. Charansonney O, Mouren S, Dufaux J, Duvelleroy M, and Vicaut E. Red blood cell aggregation and blood viscosity in an isolated heart preparation. *Biorheology* 30: 75-84, 1993.
- Chen RY, Carlin RD, Simchon S, Jan KM, and Chien S. Effects of dextran-induced hyperviscosity on regional blood flow and hemodynamics in dogs. *Am J Physiol* 256: H898-905, 1989.
- 77. Cheng C, Tempel D, Oostlander A, Helderman F, Gijsen F, Wentzel J, van Haperen R, Haitsma DB, Serruys PW, van der Steen AF, de Crom R, and Krams R. Rapamycin modulates the eNOS vs. shear stress relationship. *Cardiovasc Res* 78: 123-129, 2008.
- 78. **Chien S, Usami S, and Bertles JF**. Abnormal rheology of oxygenated blood in sickle cell anemia. *J Clin Invest* 49: 623-634, 1970.
- 79. Chong-Martinez B, Buchanan TA, Wenby RB, and Meiselman HJ. Decreased red blood cell aggregation subsequent to improved glycaemic control in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 20: 301-306, 2003.
- 80. Cicha I, Goppelt-Struebe M, Yilmaz A, Daniel WG, and Garlichs CD. Endothelial dysfunction and monocyte recruitment in cells exposed to non-uniform shear stress. *Clin Hemorheol Microcirc* 39: 113-119, 2008.
- 81. **Cipolla MJ**. 2009.
- 82. **Cipolla MJ, Li R, and Vitullo L**. Perivascular innervation of penetrating brain parenchymal arterioles. *J Cardiovasc Pharmacol* 44: 1-8, 2004.
- 83. **Cipolla MJ, and Osol G**. Vascular smooth muscle actin cytoskeleton in cerebral artery forced dilatation. *Stroke* 29: 1223-1228, 1998.
- 84. Clark MR. Mean corpuscular hemoglobin concentration and cell deformability. *Ann N* Y Acad Sci 565: 284-294, 1989.
- 85. **Cohen Z, Molinatti G, and Hamel E**. Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 894-904, 1997.
- 86. **Cokelet GC**. Hemorheology and hemodynamics. Morgan&Claypool life sciences, 2011.

- 87. Cokelet GR, and Meiselman HJ. Macro- and Micro-Rheological Properties of Blood. In: Handbook of Hemorheology and Hemodynamics, edited by Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, and Meiselman HJ. Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washinton DC: IOS Press, 2007, p. 45-71.
- 88. **Comber JT, and Lopez BL**. Evaluation of pulse oximetry in sickle cell anemia patients presenting to the emergency department in acute vasoocclusive crisis. *Am J Emerg Med* 14: 16-18, 1996.
- Connes P. Hemorheology and exercise: effects of warm environments and potential consequences for sickle cell trait carriers. *Scand J Med Sci Sports* 20 Suppl 3: 48-52, 2010.
- Connes P, and Boisseau MR. Hémorhéologie. Sang Thrombose Vaisseaux 22: 1-10, 2010.
- 91. Connes P, Bouix D, Durand F, Kippelen P, Mercier J, Prefaut C, Brun JF, and Caillaud C. Is hemoglobin desaturation related to blood viscosity in athletes during exercise? Int J Sports Med 25: 569-574, 2004.
- 92. Connes P, Bouix D, Py G, Caillaud C, Kippelen P, Brun JF, Varray A, Prefaut C, and Mercier J. Does exercise-induced hypoxemia modify lactate influx into erythrocytes and hemorheological parameters in athletes? *J Appl Physiol* 97: 1053-1058, 2004.
- 93. Connes P, Brun JF, and Baskurt OK. Blood rheology and Exercise. In: Exercise Physiology: from a Cellular to an Integrative Approach, edited by Connes P, Hue O, and Perrey S. Amsterdam, Berlin, Tokyo, Washington DC: IOS Press, 2010, p. 213-229.
- 94. Connes P, Caillaud C, Py G, Mercier J, Hue O, and Brun JF. Maximal exercise and lactate do not change red blood cell aggregation in well trained athletes. *Clin Hemorheol Microcirc* 36: 319-326, 2007.
- 95. Connes P, Frank S, Martin C, Shin S, Aufradet E, Sunoo S, Klara B, Raynaud de Mauverger E, Romana M, Messonnier L, Kang J, Varlet-Marie E, Feasson L, Hardy-Dessources MD, Wilhelm B, and Brun JF. New fundamental and applied mechanisms in exercise hemorheology. *Clin Hemorheol Microcirc* 45: 131-141, 2010.
- 96. **Connes P, Machado R, Hue O, and Reid H**. Exercise limitation, exercise testing and exercise recommendations in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc* 49: 151-163, 2011.
- 97. Connes P, Monchanin G, Perrey S, Wouassi D, Atchou G, Forsuh A, Debaud J, Djoda B, Owona FX, Francina A, Banga PE, Massarelli R, Thiriet P, and Martin C.

Oxygen uptake kinetics during heavy submaximal exercise: Effect of sickle cell trait with or without alpha-thalassemia. *Int J Sports Med* 27: 517-525, 2006.

- 98. **Connes P, Nemeth N, Meiselman HJ, and Baskurt OK**. Effect of tourniquet application during blood sampling on RBC deformability and aggregation: is it better to keep it on? *Clin Hemorheol Microcirc* 42: 297-302, 2009.
- 99. Connes P, Pichon A, Hardy-Dessources MD, Waltz X, Lamarre Y, Simmonds MJ, and Tripette J. Blood viscosity and hemodynamics during exercise. *Clin Hemorheol Microcirc* 51: 101-109, 2012.
- 100. Connes P, Romana M, Lamarre Y, Waltz X, Vent-Schmidt J, and Hardy-Dessources MD. Blood rheology in sickle cell disease. In: 14th International Congress of Biorheology and 7th International Conference on Clinical Hemorheology. Istanbul (turkey): Biorheology, 2012, p. 138-139.
- 101. Connes P, Sara F, Hardy-Dessources MD, Marlin L, Etienne F, Larifla L, Saint-Martin C, and Hue O. Effects of short supramaximal exercise on hemorheology in sickle cell trait carriers. *Eur J Appl Physiol* 97: 143-150, 2006.
- 102. Connes P, Uyuklu M, Tripette J, Boucher JH, Beltan E, Chalabi T, Yalcin O, Chout R, Hue O, Hardy-Dessources MD, and Baskurt OK. Sampling time after tourniquet removal affects erythrocyte deformability and aggregation measurements. *Clin Hemorheol Microcirc* 41: 9-15, 2009.
- 103. Connes P, Yalcin O, Baskurt O, Brun JF, and Hardeman M. In health and in a normoxic environment, VO2 max is/is not limited primarily by cardiac output and locomotor muscle blood flow. J Appl Physiol 100: 2099, 2006.
- 104. **Convertino VA, Keil LC, Bernauer EM, and Greenleaf JE**. Plasma volume, osmolality, vasopressin, and renin activity during graded exercise in man. *J Appl Physiol* 50: 123-128, 1981.
- 105. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO, 3rd, and Gladwin MT. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* 9: 1498-1505, 2003.
- 106. **Cui W, Wang N, and Chance B**. Study of photon migration depths with time-resolved spectroscopy. *Opt Lett* 16: 1632-1634, 1991.
- 107. De Blasi RA, Almenrader N, Aurisicchio P, and Ferrari M. Comparison of two methods of measuring forearm oxygen consumption (VO2) by near infrared spectroscopy. *J Biomed Optics* 2: 171-173, 1997.

- 108. **De Luca CJ**. The use of surface electromyography in biomechanics. *J Appl Biomech* 13: 135-163, 1997.
- 109. **Dempsey JA, and Wagner PD**. Exercise-induced arterial hypoxemia. *J Appl Physiol* 87: 1997-2006, 1999.
- 110. **Diamond J**. *Guns, germs, and steel. The fates of human societies.* New-York: Norton, 1997.
- 111. **Diaw M, Samb A, Diop S, Sall ND, Ba A, Cisse F, and Connes P**. Effects of hydration and water deprivation on blood viscosity during a soccer game in sickle cell trait carriers. *Br J Sports Med* 2012.
- 112. **Ditenfass L**. Red cell aggregation in cardiovascular diseases and crucial role of the inversion phenomenon. *Angiology* 36: 315-326, 1985.
- 113. Downes SM, Hambleton IR, Chuang EL, Lois N, Serjeant GR, and Bird AC. Incidence and natural history of proliferative sickle cell retinopathy: observations from a cohort study. *Ophthalmology* 112: 1869-1875, 2005.
- 114. Dreyfus B. Anémies : données biologiques utiles au diagnostic. In: L'hématologie, edited by Dreyfus B, Breton-Gorius J, Reyes F, Rochant H, Rosa J, and Vernant JP. Paris: Médecine-Sciences Flammarion, 1992, p. 291-294.
- 115. **Duling BR, and Berne RM**. Longitudinal gradients in periarteriolar oxygen tension. A possible mechanism for the participation of oxygen in local regulation of blood flow. *Circ Res* 27: 669-678, 1970.
- 116. **Duling BR, Gore RW, Dacey RG, Jr., and Damon DN**. Methods for isolation, cannulation, and in vitro study of single microvessels. *Am J Physiol* 241: H108-116, 1981.
- 117. Duncan A, Meek JH, Clemence M, Elwell CE, Fallon P, Tyszczuk L, Cope M, and Delpy DT. Measurement of cranial optical path length as a function of age using phase resolved near infrared spectroscopy. *Pediatr Res* 39: 889-894, 1996.
- 118. Duncan A, Meek JH, Clemence M, Elwell CE, Tyszczuk L, Cope M, and Delpy DT. Optical pathlength measurements on adult head, calf and forearm and the head of the newborn infant using phase resolved optical spectroscopy. *Phys Med Biol* 40: 295-304, 1995.
- 119. **Eaton WA, and Hofrichter J**. Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. *Blood* 70: 1245-1266, 1987.
- 120. **Eaton WA, Hofrichter J, and Ross PD**. Editorial: Delay time of gelation: a possible determinant of clinical severity in sickle cell disease. *Blood* 47: 621-627, 1976.

- 121. Edvinsson L, Owman C, and Siesjo B. Physiological role of cerebrovascular sympathetic nerves in the autoregulation of cerebral blood flow. *Brain Res* 117: 519-523, 1976.
- Ellsworth ML, Ellis CG, Goldman D, Stephenson AH, Dietrich HH, and Sprague RS. Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone. *Physiology* (*Bethesda*) 24: 107-116, 2009.
- 123. Emond AM, Holman R, Hayes RJ, and Serjeant GR. Priapism and impotence in homozygous sickle cell disease. *Arch Intern Med* 140: 1434-1437, 1980.
- 124. Ernst E, Matrai A, Aschenbrenner E, Will V, and Schmidlechner C. Relationship between fitness and blood fluidity. *Clin Hemorheol* 5: 507-510, 1985.
- 125. **Euser AG, and Cipolla MJ**. Cerebral blood flow autoregulation and edema formation during pregnancy in anesthetized rats. *Hypertension* 49: 334-340, 2007.
- 126. **Fabry ME, Kaul DK, Raventos-Suarez C, Chang H, and Nagel RL**. SC erythrocytes have an abnormally high intracellular hemoglobin concentration. Pathophysiological consequences. *J Clin Invest* 70: 1315-1319, 1982.
- 127. Fahraeus R. The suspension stability of the blood. Physiol Rev 9: 241-274, 1929.
- 128. **Fahraeus R, and Lindqvist T**. The viscosity of the blood in narrow capillary tubes. *The American Journal of Physiology* 96: 562-568, 1931.
- 129. Fan FC, Chen RY, Schuessler GB, and Chien S. Effects of hematocrit variations on regional hemodynamics and oxygen transport in the dog. *Am J Physiol* 238: H545-522, 1980.
- 130. **Faraci FM, and Heistad DD**. Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure. *Circ Res* 66: 8-17, 1990.
- 131. Feeling-Taylor AR, Yau ST, Petsev DN, Nagel RL, Hirsch RE, and Vekilov PG.
 Crystallization mechanisms of hemoglobin C in the R state. *Biophys J* 87: 2621-2629, 2004.
- 132. Feletou M, and Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)* 117: 139-155, 2009.
- 133. Ferrari M, Mottola L, and Quaresima V. Principles, techniques, and limitations of near infrared spectroscopy. *Can J Appl Physiol* 29: 463-487, 2004.
- 134. Filosa JA, Bonev AD, Straub SV, Meredith AL, Wilkerson MK, Aldrich RW, and Nelson MT. Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nat Neurosci* 9: 1397-1403, 2006.
- 135. **Fischer TM**. Tank-tread frequency of the red cell membrane: dependence on the viscosity of the suspending medium. *Biophys J* 93: 2553-2561, 2007.

- 136. **Fitzgerald RK, and Johnson A**. Pulse oximetry in sickle cell anemia. *Crit Care Med* 29: 1803-1806, 2001.
- 137. **Fowler JE, Jr., Koshy M, Strub M, and Chinn SK**. Priapism associated with the sickle cell hemoglobinopathies: prevalence, natural history and sequelae. *J Urol* 145: 65-68, 1991.
- 138. Foy H, Kondi A, and Brass W. Sickle-cell disease of Africans in Kenya. *East Afr Med J* 28: 1-5, 1951.
- 139. Foy H, Kondi A, Timms GL, Brass W, and Bushra F. The variability of sickle-cell rates in the tribes of Kenya and the Southern Sudan. *Br Med J* 1: 294-297, 1954.
- 140. Franco Folino A. Cerebral autoregulation and syncope. *Prog Cardiovasc Dis* 50: 49-80, 2007.
- 141. Frank AO, Chuong CJ, and Johnson RL. A finite-element model of oxygen diffusion in the pulmonary capillaries. *J Appl Physiol* 82: 2036-2044, 1997.
- 142. **Friedman MJ**. Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 1994-1997, 1978.
- 143. **Gaudard A, Varlet-Marie E, Bressolle F, Mercier J, and Brun JF**. Hemorheological correlates of fitness and unfitness in athletes: moving beyond the apparent "paradox of hematocrit"? *Clin Hemorheol Microcirc* 28: 161-173, 2003.
- 144. Geiger R, Strasak A, Treml B, Gasser K, Kleinsasser A, Fischer V, Geiger H, Loeckinger A, and Stein JI. Six-minute walk test in children and adolescents. J Pediatr 150: 395-399, 399 e391-392, 2007.
- 145. **Girot R, Bégué P, and Frédéric G**. *La drépanocytose*. Montrouge Haut-de-Seine: John Libbey & Co, 2003.
- 146. **Gladwin MT, Crawford JH, and Patel RP**. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic Biol Med* 36: 707-717, 2004.
- 147. Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, Brown B, Coles WA, Nichols JS, Ernst I, Hunter LA, Blackwelder WC, Schechter AN, Rodgers GP, Castro O, and Ognibene FP. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. N Engl J Med 350: 886-895, 2004.
- Gladwin MT, and Vichinsky E. Pulmonary complications of sickle cell disease. N Engl J Med 359: 2254-2265, 2008.
- 149. Gleeson M. Immune function in sport and exercise. J Appl Physiol 103: 693-699, 2007.
- Gnasso A, Irace C, Carallo C, De Franceschi MS, Motti C, Mattioli PL, and Pujia
 A. In vivo association between low wall shear stress and plaque in subjects with asymmetrical carotid atherosclerosis. *Stroke* 28: 993-998, 1997.
- 151. Goldstein GW, and Betz AL. The blood-brain barrier. Sci Am 255: 74-83, 1986.
- 152. Gordeuk VR, Sachdev V, Taylor JG, Gladwin MT, Kato G, and Castro OL. Relative systemic hypertension in patients with sickle cell disease is associated with risk of pulmonary hypertension and renal insufficiency. *Am J Hematol* 83: 15-18, 2008.
- 153. **Gordon GR, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GC, and MacVicar BA**. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 456: 745-749, 2008.
- 154. **Gori T, Dragoni S, Di Stolfo G, and Forconi S**. Endothelium and haemorheology. *Ann Ist Super Sanita* 43: 124-129, 2007.
- 155. **Gori T, and Forconi S**. The role of reactive free radicals in ischemic preconditioning-clinical and evolutionary implications. *Clin Hemorheol Microcirc* 33: 19-28, 2005.
- Hahn EV, and Gillespie EB. Sickle cell anemia. Report of a case greatly imporved by splenectomy. Experimental study of sickle cell formation. *Arch Intern Med* 39: 233-254, 1927.
- 157. **Haldane JBS**. The rate of mutation of human genes. *Hereditas Suppl* 35: 267-273, 1949.
- 158. Hamaoka T, Katsumura T, Murase N, Sako T, Higuchi H, Murakami M, Esaki K, Kime R, Homma T, Sugeta A, Kurosawa Y, Shimomitsu T, and Chance B. Muscle oxygen consumption at onset of exercise by near infrared spectroscopy in humans. *Adv Exp Med Biol* 530: 475-483, 2003.
- 159. **Hamel E**. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* 100: 1059-1064, 2006.
- 160. **Hamilton NB, Attwell D, and Hall CN**. Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front Neuroenergetics* 2: 2010.
- 161. **Hammond MD, Gale GE, Kapitan KS, Ries A, and Wagner PD**. Pulmonary gas exchange in humans during normobaric hypoxic exercise. *J Appl Physiol* 61: 1749-1757, 1986.
- 162. Hannemann A, Weiss E, Rees DC, Dalibalta S, Ellory JC, and Gibson JS. The Properties of Red Blood Cells from Patients Heterozygous for HbS and HbC (HbSC Genotype). Anemia 2011: 248527, 2011.

- Hardeman MR, Dobbe JG, and Ince C. The Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer. *Clin Hemorheol Microcirc* 25: 1-11, 2001.
- 164. Harder DR, Narayanan J, Birks EK, Liard JF, Imig JD, Lombard JH, Lange AR, and Roman RJ. Identification of a putative microvascular oxygen sensor. *Circ Res* 79: 54-61, 1996.
- 165. Hargrave DR, Wade A, Evans JP, Hewes DK, and Kirkham FJ. Nocturnal oxygen saturation and painful sickle cell crises in children. *Blood* 101: 846-848, 2003.
- 166. **Harris JW**. Studies on the destruction of red blood cells. VIII. Molecular orientation in sickle cell hemoglobin solutions. *Proc Soc Exp Biol Med* 75: 197-201, 1950.
- 167. Haymann JP, Stankovic K, Levy P, Avellino V, Tharaux PL, Letavernier E, Grateau G, Baud L, Girot R, and Lionnet F. Glomerular hyperfiltration in adult sickle cell anemia: a frequent hemolysis associated feature. *Clin J Am Soc Nephrol* 5: 756-761, 2010.
- 168. **Haymond S**. Oxygen Saturation a guide to Laboratory Assessment. *Clinical laboratory News* 2006.
- 169. Hebbel RP. Reconstructing sickle cell disease: a data-based analysis of the "hyperhemolysis paradigm" for pulmonary hypertension from the perspective of evidence-based medicine. *Am J Hematol* 86: 123-154, 2011.
- 170. **Heistad DD**. What's new in the cerebral microcirculation? Landis Award lecture. *Microcirculation* 8: 365-375, 2001.
- 171. Herold S, Brozovic M, Gibbs J, Lammertsma AA, Leenders KL, Carr D, Fleming JS, and Jones T. Measurement of regional cerebral blood flow, blood volume and oxygen metabolism in patients with sickle cell disease using positron emission tomography. *Stroke* 17: 692-698, 1986.
- 172. Herrick JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Intern Med* 6: 517-521, 1910.
- 173. Heyman A, Patterson JL, Jr., and Duke TW. Cerebral circulation and metabolism in sickle cell and other chronic anemias, with observations on the effects of oxygen inhalation. J Clin Invest 31: 824-828, 1952.
- 174. Hightower CM, Salazar Vazquez BY, Woo Park S, Sriram K, Martini J, Yalcin O, Tsai AG, Cabrales P, Tartakovsky DM, Johnson PC, and Intaglietta M. Integration of cardiovascular regulation by the blood/endothelium cell-free layer. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 3: 458-470, 2011.

- 175. **Hitt AL, and Luna EJ**. Membrane interactions with the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 6: 120-130, 1994.
- 176. Hofrichter J, Ross PD, and Eaton WA. Kinetics and mechanism of deoxyhemoglobin S gelation: a new approach to understanding sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 4864-4868, 1974.
- 177. Holash JA, Noden DM, and Stewart PA. Re-evaluating the role of astrocytes in blood-brain barrier induction. *Dev Dyn* 197: 14-25, 1993.
- 178. Homi J, Levee L, Higgs D, Thomas P, and Serjeant G. Pulse oximetry in a cohort study of sickle cell disease. *Clin Lab Haematol* 19: 17-22, 1997.
- 179. Hopkins SR, Schoene RB, Henderson WR, Spragg RG, Martin TR, and West JB. Intense exercise impairs the integrity of the pulmonary blood-gas barrier in elite athletes. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 1090-1094, 1997.
- 180. **Hossmann KA**. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol* 26: 1057-1083, 2006.
- 181. **Hossmann KA**. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36: 557-565, 1994.
- 182. Hsia CC. Respiratory function of hemoglobin. N Engl J Med 338: 239-247, 1998.
- Hsia CC, Johnson RL, Jr., and Shah D. Red cell distribution and the recruitment of pulmonary diffusing capacity. J Appl Physiol 86: 1460-1467, 1999.
- 184. Hsia CCW. Pulmonary diffusion, Ventilation-Perfusion Ratio and Arterial Oxygen Homeostasis. In: *Exercise Physiology: from a Cellular to an Integrative Approach*, edited by Connes P, Hue O, and Perrey S. Amsterdam, Berlin, Tokyo, Washington DC: IOS Press, 2010, p. 95-116.
- 185. **Hudetz AG**. Blood flow in the cerebral capillary network: a review emphasizing observations with intravital microscopy. *Microcirculation* 4: 233-252, 1997.
- 186. **Iadecola C**. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5: 347-360, 2004.
- 187. Ido Y, Chang K, Woolsey TA, and Williamson JR. NADH: sensor of blood flow need in brain, muscle, and other tissues. *FASEB J* 15: 1419-1421, 2001.
- 188. Imray CH, Pattinson KT, Myers S, Chan CW, Hoar H, Brearey S, Collins P, and Wright AD. Intrapulmonary and intracardiac shunting with exercise at altitude. Wilderness Environ Med 19: 199-204, 2008.
- 189. **Ingram VM**. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature* 180: 326-328, 1957.

- 190. Intaglietta M, Johnson PC, and Winslow RM. Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res* 32: 632-643, 1996.
- 191. **Isbister JP**. Physiology and pathophysiology of blood volume regulation. *Transfus Sci* 18: 409-423, 1997.
- 192. Jama AH, Salem AH, and Dabbous IA. Massive splenic infarction in Saudi patients with sickle cell anemia: a unique manifestation. *Am J Hematol* 69: 205-209, 2002.
- 193. Jamsek J, and Stefanovska A. The cardio-respiratory couplings observed in the LDF signal using wavelet bispectrum. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2007: 4072-4075, 2007.
- 194. Janzer RC, and Raff MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325: 253-257, 1987.
- 195. **Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, and Stamler JS**. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380: 221-226, 1996.
- 196. **Jobsis FF**. Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science* 198: 1264-1267, 1977.
- 197. Johansson B, Li CL, Olsson Y, and Klatzo I. The effect of acute arterial hypertension on the blood-brain barrier to protein tracers. *Acta Neuropathol* 16: 117-124, 1970.
- 198. Kan YW, and Dozy AM. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human betaglobin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 5631-5635, 1978.
- 199. **Kato GJ, Gladwin MT, and Steinberg MH**. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev* 21: 37-47, 2007.
- 200. **Kato GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, and Gladwin MT**. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *Am J Hematol* 84: 618-625, 2009.
- 201. Kato GJ, McGowan V, Machado RF, Little JA, Taylor Jt, Morris CR, Nichols JS, Wang X, Poljakovic M, Morris SM, Jr., and Gladwin MT. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood* 107: 2279-2285, 2006.
- 202. Kato GJ, Onyekwere OC, and Gladwin MT. Pulmonary hypertension in sickle cell disease: relevance to children. *Pediatr Hematol Oncol* 24: 159-170, 2007.

- 203. **Kaul DK, and Fabry ME**. In vivo studies of sickle red blood cells. *Microcirculation* 11: 153-165, 2004.
- 204. **Kim S, Popel AS, Intaglietta M, and Johnson PC**. Effect of erythrocyte aggregation at normal human levels on functional capillary density in rat spinotrapezius muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H941-947, 2006.
- 205. Kinney TR, Sleeper LA, Wang WC, Zimmerman RA, Pegelow CH, Ohene-Frempong K, Wethers DL, Bello JA, Vichinsky EP, Moser FG, Gallagher DM, DeBaun MR, Platt OS, and Miller ST. Silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: a risk factor analysis. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Pediatrics* 103: 640-645, 1999.
- 206. Kirkham FJ, Hewes DK, Prengler M, Wade A, Lane R, and Evans JP. Nocturnal hypoxaemia and central-nervous-system events in sickle-cell disease. *Lancet* 357: 1656-1659, 2001.
- 207. **Kislukhin VV**. Stochasticity of flow through microcirculation as a regulator of oxygen delivery. *Theor Biol Med Model* 7: 29, 2010.
- Klitzman B, Damon DN, Gorczynski RJ, and Duling BR. Augmented tissue oxygen supply during striated muscle contraction in the hamster. Relative contributions of capillary recruitment, functional dilation, and reduced tissue PO2. *Circ Res* 51: 711-721, 1982.
- 209. **Knot HJ, Zimmermann PA, and Nelson MT**. Extracellular K(+)-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K(+) channels. *J Physiol* 492 (Pt 2): 419-430, 1996.
- 210. **Ko KR, Ngai AC, and Winn HR**. Role of adenosine in regulation of regional cerebral blood flow in sensory cortex. *Am J Physiol* 259: H1703-1708, 1990.
- 211. **Kobari M, Fukuuchi Y, Tomita M, Tanahashi N, and Takeda H**. Role of nitric oxide in regulation of cerebral microvascular tone and autoregulation of cerebral blood flow in cats. *Brain Res* 667: 255-262, 1994.
- 212. **Koller A, and Toth P**. Contribution of Flow-Dependent Vasomotor Mechanisms to the Autoregulation of Cerebral Blood Flow. *J Vasc Res* 49: 375-389, 2012.
- Kontos HA, Wei EP, Raper AJ, Rosenblum WI, Navari RM, and Patterson JL, Jr. Role of tissue hypoxia in local regulation of cerebral microcirculation. *Am J Physiol* 234: H582-591, 1978.
- 214. Koshy M, Entsuah R, Koranda A, Kraus AP, Johnson R, Bellvue R, Flournoy-Gill
 Z, and Levy P. Leg ulcers in patients with sickle cell disease. *Blood* 74: 1403-1408, 1989.

- 215. **Krum JM, Kenyon KL, and Rosenstein JM**. Expression of blood-brain barrier characteristics following neuronal loss and astroglial damage after administration of anti-Thy-1 immunotoxin. *Exp Neurol* 146: 33-45, 1997.
- 216. **Kutlar A, Hattori Y, Bakioglu I, Kutlar F, Kamel K, and Huisman TH**. Hematological observations on Arabian SS patients with a homozygosity or heterozygosity for a beta S chromosome with haplotype #31. *Hemoglobin* 9: 545-557, 1985.
- 217. Kvandal P, Landsverk SA, Bernjak A, Stefanovska A, Kvernmo HD, and Kirkeboen KA. Low-frequency oscillations of the laser Doppler perfusion signal in human skin. *Microvasc Res* 72: 120-127, 2006.
- 218. **Kvernmo HD, Stefanovska A, Bracic M, Kirkeboen KA, and Kvernebo K**. Spectral analysis of the laser Doppler perfusion signal in human skin before and after exercise. *Microvasc Res* 56: 173-182, 1998.
- 219. **Kvernmo HD, Stefanovska A, Kirkeboen KA, and Kvernebo K**. Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators. *Microvasc Res* 57: 298-309, 1999.
- 220. Lamarre Y, Romana M, Waltz X, Lalanne-Mistrih ML, Tressières B, Divialle-Doumdo L, Dessources MD, Vent-Schmidt J, Petras M, Broquere C, Maillard F, Tarer V, Etienne-Julan M, and Connes P. Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in sickle cell disease. *Haematologia* 2012.
- 221. Lapoumeroulie C, Dunda O, Ducrocq R, Trabuchet G, Mony-Lobe M, Bodo JM, Carnevale P, Labie D, Elion J, and Krishnamoorthy R. A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. *Hum Genet* 89: 333-337, 1992.
- Laub M, Hvid-Jacobsen K, Hovind P, Kanstrup IL, Christensen NJ, and Nielsen SL. Spleen emptying and venous hematocrit in humans during exercise. *J Appl Physiol* 74: 1024-1026, 1993.
- Lawrence C, Fabry ME, and Nagel RL. The unique red cell heterogeneity of SC disease: crystal formation, dense reticulocytes, and unusual morphology. *Blood* 78: 2104-2112, 1991.
- 224. Lecoq J, Tiret P, Najac M, Shepherd GM, Greer CA, and Charpak S. Odor-evoked oxygen consumption by action potential and synaptic transmission in the olfactory bulb. *J Neurosci* 29: 1424-1433, 2009.
- 225. Lemaire C, Lamarre Y, Lemonne N, Waltz X, Chahed S, Cabot F, Botez I, Tressières B, Lalanne-Mistrih ML, Etienne-Julan M, and Connes P. Severe

proliferative retinopathy is associated with blood hyperviscosity in sickle cell hemoglobin-C disease but not in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc* In press.

- 226. Li Z, Wang Y, Li Y, Li J, and Zhang L. Wavelet analysis of cerebral oxygenation signal measured by near infrared spectroscopy in subjects with cerebral infarction. *Microvasc Res* 80: 142-147, 2010.
- 227. Liebeskind DS. Collateral circulation. Stroke 34: 2279-2284, 2003.
- 228. Liem RI, Nevin MA, Prestridge A, Young LT, and Thompson AA. Functional capacity in children and young adults with sickle cell disease undergoing evaluation for cardiopulmonary disease. *Am J Hematol* 84: 645-649, 2009.
- 229. Lin MJ, Nagel RL, and Hirsch RE. Acceleration of hemoglobin C crystallization by hemoglobin S. *Blood* 74: 1823-1825, 1989.
- 230. Lionnet F, Hammoudi N, Stojanovic KS, Avellino V, Grateau G, Girot R, and Haymann JP. Hemoglobin sickle cell disease complications: a clinical study of 179 cases. *Haematologica* 97: 1136-1141, 2012.
- 231. Lipovac V, Gavella M, Turck Z, and Skrabalo Z. Influence of lactate on the insulin action on red blood cell filterability. *Clin Hemorheol* 5: 421-428, 1985.
- 232. Lipowsky HH, Cram LE, Justice W, and Eppihimer MJ. Effect of erythrocyte deformability on in vivo red cell transit time and hematocrit and their correlation with in vitro filterability. *Microvasc Res* 46: 43-64, 1993.
- 233. Lipowsky HH, Sheikh NU, and Katz DM. Intravital microscopy of capillary hemodynamics in sickle cell disease. *J Clin Invest* 80: 117-127, 1987.
- 234. Lonsdorfer J, Bogui P, Otayeck A, Bursaux E, Poyart C, and Cabannes R. Cardiorespiratory adjustments in chronic sickle cell anemia. *Bull Eur Physiopathol Respir* 19: 339-344, 1983.
- 235. Lopez BL, Cogen JF, Kerkula L, Corbin T, and Flenders P. Pulse oximetry in the adult ED patient with sickle cell. *Am J Emerg Med* 23: 429-432, 2005.
- 236. Lopez C, Saravia C, Gomez A, Hoebeke J, and Patarroyo MA. Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. *Gene* 467: 1-12, 2010.
- 237. Lovick TA, Brown LA, and Key BJ. Neurovascular relationships in hippocampal slices: physiological and anatomical studies of mechanisms underlying flowmetabolism coupling in intraparenchymal microvessels. *Neuroscience* 92: 47-60, 1999.

- 238. Lysiak JJ, Nguyen QA, and Turner TT. Fluctuations in rat testicular interstitial oxygen tensions are linked to testicular vasomotion: persistence after repair of torsion. *Biol Reprod* 63: 1383-1389, 2000.
- 239. **Mahler F**. [Dynamic measurement of blood pressure in human nailfold capillaries]. *Fortschr Med* 97: 873-876, 1979.
- 240. **Mahler F, Muheim MH, Intaglietta M, Bollinger A, and Anliker M**. Blood pressure fluctuations in human nailfold capillaries. *Am J Physiol* 236: H888-893, 1979.
- 241. **Makis AC, Hatzimichael EC, and Bourantas KL**. The role of cytokines in sickle cell disease. *Ann Hematol* 79: 407-413, 2000.
- 242. **Malek AM, Izumo S, and Alper SL**. Modulation by pathophysiological stimuli of the shear stress-induced up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Neurosurgery* 45: 334-344; discussion 344-335, 1999.
- 243. Marieb EN. Anatomie et physiologie humaines. Canada: DeBoeck Université, 1999.
- 244. Marotta CA, Forget BG, Cohne-Solal M, Wilson JT, and Weissman SM. Human beta-globin messenger RNA. I. Nucleotide sequences derived from complementary RNA. J Biol Chem 252: 5019-5031, 1977.
- 245. **Martin DG, Ferguson EW, Wigutoff S, Gawne T, and Schoomaker EB**. Blood viscosity responses to maximal exercise in endurance-trained and sedentary female subjects. *J Appl Physiol* 59: 348-353, 1985.
- 246. **McCarron JG, and Halpern W**. Potassium dilates rat cerebral arteries by two independent mechanisms. *Am J Physiol* 259: H902-908, 1990.
- 247. **McCurdy PR, Mahmood L, and Sherman AS**. Red cell life span in sickle cellhemoglobin C disease with a note about sickle cell-hemoglobin O ARAB. *Blood* 45: 273-279, 1975.
- 248. **McCurdy PR, and Sherman AS**. Irreversibly sickled cells and red cell survival in sickle cell anemia: a study with both DF32P and 51CR. *Am J Med* 64: 253-258, 1978.
- 249. **McHedlishvili G, Gobejishvili L, and Beritashvili N**. Effect of intensified red blood cell aggregability on arterial pressure and mesenteric microcirculation. *Microvasc Res* 45: 233-242, 1993.
- 250. **McHedlishvili G, and Maeda N**. Blood flow structure related to red cell flow: determinant of blood fluidity in narrow microvessels. *Jpn J Physiol* 51: 19-30, 2001.
- 251. **Mellander S**. Functional aspects of myogenic vascular control. *J Hypertens Suppl* 7: S21-30; discussion S31, 1989.
- 252. **Metea MR, and Newman EA**. Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *J Neurosci* 26: 2862-2870, 2006.

- Meyer JU, Borgstrom P, Lindbom L, and Intaglietta M. Vasomotion patterns in skeletal muscle arterioles during changes in arterial pressure. *Microvasc Res* 35: 193-203, 1988.
- 254. Miller DM, Winslow RM, Klein HG, Wilson KC, Brown FL, and Statham NJ. Improved exercise performance after exchange transfusion in subjects with sickle cell anemia. *Blood* 56: 1127-1131, 1980.
- 255. **Miller JM, and Johnson RL, Jr.** Effect of lung inflation on pulmonary diffusing capacity at rest and exercise. *J Clin Invest* 45: 493-500, 1966.
- 256. Milner PF, Kraus AP, Sebes JI, Sleeper LA, Dukes KA, Embury SH, Bellevue R, Koshy M, Moohr JW, and Smith J. Sickle cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head. *N Engl J Med* 325: 1476-1481, 1991.
- 257. Minniti CP, Sable C, Campbell A, Rana S, Ensing G, Dham N, Onyekwere O, Nouraie M, Kato GJ, Gladwin MT, Castro OL, and Gordeuk VR. Elevated tricuspid regurgitant jet velocity in children and adolescents with sickle cell disease: association with hemolysis and hemoglobin oxygen desaturation. *Haematologica* 94: 340-347, 2009.
- 258. Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Simpore J, Verra F, Konate A, Rastrelli E, Olivieri A, Calissano C, Paganotti GM, D'Urbano L, Sanou I, Sawadogo A, Modiano G, and Coluzzi M. Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria. *Nature* 414: 305-308, 2001.
- 259. **Mohandas N, Rossi ME, and Clark MR**. Association between morphologic distortion of sickle cells and deoxygenation-induced cation permeability increase. *Blood* 68: 450-454, 1986.
- 260. Monchanin G, Connes P, Wouassi D, Francina A, Djoda B, Banga PE, Owona FX, Thiriet P, Massarelli R, and Martin C. Hemorheology, sickle cell trait, and alpha-thalassemia in athletes: effects of exercise. *Med Sci Sports Exerc* 37: 1086-1092, 2005.
- 261. **Montoya JJ, Fernandez N, Monge L, Dieguez G, and Villalon AL**. Nitric oxidemediated relaxation to lactate of coronary circulation in the isolated perfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 58: 392-398, 2011.
- 262. Moser FG, Miller ST, Bello JA, Pegelow CH, Zimmerman RA, Wang WC, Ohene-Frempong K, Schwartz A, Vichinsky EP, Gallagher D, and Kinney TR. The spectrum of brain MR abnormalities in sickle-cell disease: a report from the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 17: 965-972, 1996.

- 263. **Mozzarelli A, Hofrichter J, and Eaton WA**. Delay time of hemoglobin S polymerization prevents most cells from sickling in vivo. *Science* 237: 500-506, 1987.
- 264. **Mulligan SJ, and MacVicar BA**. Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431: 195-199, 2004.
- 265. **Nag S**. Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels. *Methods Mol Med* 89: 3-36, 2003.
- 266. Nagel RL, Fabry ME, and Steinberg MH. The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Rev* 17: 167-178, 2003.
- 267. Nagel RL, and Steinberg MH. Hemoglobin SC disease and HbC disorders. In: Disorders of Hemoglobin, edited by Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, and Nagel RL. Cambridge: Cambridge University Press, 2001, p. 756-785.
- 268. Nahavandi M, Nichols JP, Hassan M, Gandjbakhche A, and Kato GJ. Nearinfrared spectra absorbance of blood from sickle cell patients and normal individuals. *Hematology* 14: 46-48, 2009.
- 269. Nahavandi M, Tavakkoli F, Hasan SP, Wyche MQ, and Castro O. Cerebral oximetry in patients with sickle cell disease. *Eur J Clin Invest* 34: 143-148, 2004.
- 270. Nebor D, Bowers A, Hardy-Dessources MD, Knight-Madden J, Romana M, Reid H, Barthelemy JC, Cumming V, Hue O, Elion J, Reid M, and Connes P. Frequency of pain crises in sickle cell anemia and its relationship with the sympathovagal balance, blood viscosity and inflammation. *Haematologica* 96: 1589-1594, 2011.
- 271. Nebor D, Broquere C, Brudey K, Mougenel D, Tarer V, Connes P, Elion J, and Romana M. Alpha-thalassemia is associated with a decreased occurrence and a delayed age-at-onset of albuminuria in sickle cell anemia patients. *Blood Cells Mol Dis* 45: 154-158, 2010.
- 272. Needleman JP, Franco ME, Varlotta L, Reber-Brodecki D, Bauer N, Dampier C, and Allen JL. Mechanisms of nocturnal oxyhemoglobin desaturation in children and adolescents with sickle cell disease. *Pediatr Pulmonol* 28: 418-422, 1999.
- 273. Needleman JP, Setty BN, Varlotta L, Dampier C, and Allen JL. Measurement of hemoglobin saturation by oxygen in children and adolescents with sickle cell disease. *Pediatr Pulmonol* 28: 423-428, 1999.
- 274. **Neel JV**. The Inheritance of Sickle Cell Anemia. *Science* 110: 64-66, 1949.
- 275. **Neu B, and Meiselman HJ**. Red Blood Cell Aggregation. In: *Handbook of hemorheology and hemodynamics*, edited by Baskurt OK, Hardeman PR, Rampling

MW, and Meiselman HJ. Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington DC: IOS Press, 2007, p. 114-136.

- 276. **Neuhaus D, Behn C, and Gaehtgens P**. Haemorheology and exercise: intrinsic flow properties of blood in marathon running. *Int J Sports Med* 13: 506-511, 1992.
- 277. **Nguyen TS, Winn HR, and Janigro D**. ATP-sensitive potassium channels may participate in the coupling of neuronal activity and cerebrovascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H878-885, 2000.
- 278. Nolan VG, Baldwin C, Ma Q, Wyszynski DF, Amirault Y, Farrell JJ, Bisbee A, Embury SH, Farrer LA, and Steinberg MH. Association of single nucleotide polymorphisms in klotho with priapism in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 128: 266-272, 2005.
- 279. Nolan VG, Wyszynski DF, Farrer LA, and Steinberg MH. Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. *Blood* 106: 3264-3267, 2005.
- 280. **Nordt FJ**. Hemorheology in cerebrovascular diseases: approaches to drug development. *Ann N Y Acad Sci* 416: 651-661, 1983.
- 281. Nur E, Kim YS, Truijen J, van Beers EJ, Davis SC, Brandjes DP, Biemond BJ, and van Lieshout JJ. Cerebrovascular reserve capacity is impaired in patients with sickle cell disease. *Blood* 114: 3473-3478, 2009.
- 282. Obrig H, Neufang M, Wenzel R, Kohl M, Steinbrink J, Einhaupl K, and Villringer
 A. Spontaneous low frequency oscillations of cerebral hemodynamics and metabolism in human adults. *Neuroimage* 12: 623-639, 2000.
- 283. Offenhauser N, Thomsen K, Caesar K, and Lauritzen M. Activity-induced tissue oxygenation changes in rat cerebellar cortex: interplay of postsynaptic activation and blood flow. *J Physiol* 565: 279-294, 2005.
- 284. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, Wethers DL, Pegelow CH, and Gill FM. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood* 91: 288-294, 1998.
- 285. Oliveira C, Simoes M, Carvalho J, and Ribeiro J. Combined exercise for people with type 2 diabetes mellitus: A systematic review. *Diabetes Res Clin Pract* 2012.
- 286. Oostenbrug GS, Mensink RP, Hardeman MR, De Vries T, Brouns F, and Hornstra G. Exercise performance, red blood cell deformability, and lipid peroxidation: effects of fish oil and vitamin E. *J Appl Physiol* 83: 746-752, 1997.
- 287. Orkin SH, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, Waber PG, and Giardina PJ. Linkage of beta-thalassaemia mutations and beta-

globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human beta-globin gene cluster. *Nature* 296: 627-631, 1982.

- 288. **Osol G, Brekke JF, McElroy-Yaggy K, and Gokina NI**. Myogenic tone, reactivity, and forced dilatation: a three-phase model of in vitro arterial myogenic behavior. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H2260-2267, 2002.
- 289. **Osol G, and Halpern W**. Spontaneous vasomotion in pressurized cerebral arteries from genetically hypertensive rats. *Am J Physiol* 254: H28-33, 1988.
- 290. Pagnier J, Mears JG, Dunda-Belkhodja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL, and Labie D. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 1771-1773, 1984.
- 291. **Pardridge WM**. Drug delivery to the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 713-731, 1997.
- 292. **Parthasarathi K, and Lipowsky HH**. Capillary recruitment in response to tissue hypoxia and its dependence on red blood cell deformability. *Am J Physiol* 277: H2145-2157, 1999.
- 293. **Pashankar FD, Carbonella J, Bazzy-Asaad A, and Friedman A**. Longitudinal follow up of elevated pulmonary artery pressures in children with sickle cell disease. *Br J Haematol* 144: 736-741, 2009.
- Patel RP, Hogg N, Spencer NY, Kalyanaraman B, Matalon S, and Darley-Usmar VM. Biochemical characterization of human S-nitrosohemoglobin. Effects on oxygen binding and transnitrosation. *J Biol Chem* 274: 15487-15492, 1999.
- 295. **Paterno R, Heistad DD, and Faraci FM**. Potassium channels modulate cerebral autoregulation during acute hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H2003-2007, 2000.
- 296. **Pauling L, Itano HA, and et al.** Sickle cell anemia a molecular disease. *Science* 110: 543-548, 1949.
- 297. Pegelow CH, Colangelo L, Steinberg M, Wright EC, Smith J, Phillips G, and Vichinsky E. Natural history of blood pressure in sickle cell disease: risks for stroke and death associated with relative hypertension in sickle cell anemia. *Am J Med* 102: 171-177, 1997.
- 298. Pegelow CH, Macklin EA, Moser FG, Wang WC, Bello JA, Miller ST, Vichinsky EP, DeBaun MR, Guarini L, Zimmerman RA, Younkin DP, Gallagher DM, and Kinney TR. Longitudinal changes in brain magnetic resonance imaging findings in children with sickle cell disease. *Blood* 99: 3014-3018, 2002.

- 299. **Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, and Attwell D**. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 443: 700-704, 2006.
- 300. **Perrey S**. Non-invasive NIR spectroscopy of human brain function during exercise. *Methods* 45: 289-299, 2008.
- 301. **Perutz MF, and Mitchison JM**. State of haemoglobin in sickle-cell anaemia. *Nature* 166: 677-679, 1950.
- 302. **Perutz RR, Liquori AM, and Eirich F**. X-ray and solubility studies of the haemoglobin of sickle-cell anaemia patients. *Nature* 167: 929-931, 1951.
- 303. **Piers N**. Control of Cerebral Blood Flow. In: *Tutorials in endovascular Neurosurgery and Interventional Neuroradiology*, edited by Springer-Verlag. Berlin: 2012.
- 304. **Pittman RN**. Regulation of tissue oxygenation. In: *Integrated systems physiology: from molecule to function to disease*, edited by sciences MCI. San Rafael (CA): 2011.
- 305. **Platt OS**. The acute chest syndrome of sickle cell disease. *N Engl J Med* 342: 1904-1907, 2000.
- 306. **Platt OS**. Exercise-induced hemolysis in sickle cell anemia: shear sensitivity and erythrocyte dehydration. *Blood* 59: 1055-1060, 1982.
- 307. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, and Klug PP. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 330: 1639-1644, 1994.
- Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, and Kinney TR. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med* 325: 11-16, 1991.
- 309. Ploutz-Snyder LL, Convertino VA, and Dudley GA. Resistance exercise-induced fluid shifts: change in active muscle size and plasma volume. *Am J Physiol* 269: R536-543, 1995.
- 310. Poiseuille JLM. Recherches expérimentales sur le mouvement des liquides dans les tubes de très petits diamètres. Mémoires présentés par divers savants à l'académie royale des sciences de l'institut de France 9: 433-544, 1846.
- 311. **Porter JT, and McCarthy KD**. Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 16: 5073-5081, 1996.
- 312. **Powars D, Chan LS, and Schroeder WA**. The variable expression of sickle cell disease is genetically determined. *Semin Hematol* 27: 360-376, 1990.
- 313. Powers SK, Dodd S, Lawler J, Landry G, Kirtley M, McKnight T, and Grinton S. Incidence of exercise induced hypoxemia in elite endurance athletes at sea level. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 58: 298-302, 1988.

- 314. **Prefaut C, Anselme-Poujol F, and Caillaud C**. Inhibition of histamine release by nedocromil sodium reduces exercise-induced hypoxemia in master athletes. *Med Sci Sports Exerc* 29: 10-16, 1997.
- 315. **Prefaut C, Durand F, Mucci P, and Caillaud C**. Exercise-induced arterial hypoxaemia in athletes: a review. *Sports Med* 30: 47-61, 2000.
- 316. **Pries AR, and Secomb TW**. Microvascular blood viscosity in vivo and the endothelial surface layer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H2657-2664, 2005.
- 317. **Pries AR, Secomb TW, and Gaehtgens P**. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* 440: 653-666, 2000.
- 318. **Prohovnik I, Pavlakis SG, Piomelli S, Bello J, Mohr JP, Hilal S, and De Vivo DC**. Cerebral hyperemia, stroke, and transfusion in sickle cell disease. *Neurology* 39: 344-348, 1989.
- 319. **Puro DG**. Physiology and pathobiology of the pericyte-containing retinal microvasculature: new developments. *Microcirculation* 14: 1-10, 2007.
- 320. **Pyne DB**. Exercise-induced muscle damage and inflammation: a review. *Aust J Sci Med Sport* 26: 49-58, 1994.
- Quinn CT, and Ahmad N. Clinical correlates of steady-state oxyhaemoglobin desaturation in children who have sickle cell disease. *Br J Haematol* 131: 129-134, 2005.
- 322. Quinn CT, and Dowling MM. Cerebral tissue hemoglobin saturation in children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer* 59: 881-887, 2012.
- 323. **Quinn CT, and Sargent JW**. Daytime steady-state haemoglobin desaturation is a risk factor for overt stroke in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 140: 336-339, 2008.
- 324. Rackoff WR, Kunkel N, Silber JH, Asakura T, and Ohene-Frempong K. Pulse oximetry and factors associated with hemoglobin oxygen desaturation in children with sickle cell disease. *Blood* 81: 3422-3427, 1993.
- 325. **Ragusa A, Lombardo M, Sortino G, Lombardo T, Nagel RL, and Labie D**. Beta S gene in Sicily is in linkage disequilibrium with the Benin haplotype: implications for gene flow. *Am J Hematol* 27: 139-141, 1988.
- 326. **Raj A, Bertolone SJ, Mangold S, and Edmonds HL, Jr.** Assessment of cerebral tissue oxygenation in patients with sickle cell disease: effect of transfusion therapy. *J Pediatr Hematol Oncol* 26: 279-283, 2004.
- 327. **Rampling MW**. Compositional Properties of Blood. In: *Handbood of hemorheology and hemodynamics*, edited by Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, and

Meiselman HJ. Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington DC: IOS Press, 2007, p. 34-44.

- 328. **Ramsauer M, Krause D, and Dermietzel R**. Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *FASEB J* 16: 1274-1276, 2002.
- 329. **Raper AB**. The incidence of sicklaemia. *East Afr Med J* 26: 281-282, 1949.
- 330. Reinhard M, Wehrle-Wieland E, Grabiak D, Roth M, Guschlbauer B, Timmer J, Weiller C, and Hetzel A. Oscillatory cerebral hemodynamics--the macro- vs. microvascular level. J Neurol Sci 250: 103-109, 2006.
- 331. **Reinhart WH, and Singh A**. Erythrocyte aggregation: the roles of cell deformability and geometry. *Eur J Clin Invest* 20: 458-462, 1990.
- 332. **Rennels ML, and Nelson E**. Capillary innervation in the mammalian central nervous system: an electron microscopic demonstration. *Am J Anat* 144: 233-241, 1975.
- 333. **Richardson T, and Guyton A**. Effects of polycythemia and anemia on cardiac output and other circulatory factors. *Am J Physiol* 197: 1167-1170, 1959.
- 334. **Roberts DJ, and Williams TN**. Haemoglobinopathies and resistance to malaria. *Redox Rep* 8: 304-310, 2003.
- 335. Rodgers GP, Schechter AN, Noguchi CT, Klein HG, Nienhuis AW, and Bonner RF. Periodic microcirculatory flow in patients with sickle-cell disease. N Engl J Med 311: 1534-1538, 1984.
- 336. **Rogausch H**. The apparent viscosity of aggregating and non-aggregating erythrocyte suspensions in the isolated perfused liver. *Biorheology* 24: 163-171, 1987.
- 337. **Roman RJ**. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev* 82: 131-185, 2002.
- 338. **Rubin LL**. The blood-brain barrier in and out of cell culture. *Curr Opin Neurobiol* 1: 360-363, 1991.
- 339. Rupp T. Responsabilité de la commande motrice centrale dans la fatigue neuromusculaire. In: Faculté des sciences du sport et de l'éducation physique. Montpellier: Université de Montpellier 1, 2008.
- 340. **Sakurai T, and Terui N**. Effects of sympathetically induced vasomotion on tissuecapillary fluid exchange. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1761-1767, 2006.
- 341. Salazar Vazquez BY, Cabrales P, Tsai AG, and Intaglietta M. Nonlinear cardiovascular regulation consequent to changes in blood viscosity. *Clin Hemorheol Microcirc* 49: 29-36, 2011.
- 342. Sangkatumvong S, Khoo MC, Kato R, Detterich JA, Bush A, Keens TG, Meiselman HJ, Wood JC, and Coates TD. Peripheral vasoconstriction and

abnormal parasympathetic response to sighs and transient hypoxia in sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med* 184: 474-481, 2011.

 Schmidt JA, Borgstrom P, Firestone GP, von Wichert P, Intaglietta M, and Fronek A. Periodic hemodynamics (flow motion) in peripheral arterial occlusive disease. J Vasc Surg 18: 207-215, 1993.

344. Schroeter ML, Bucheler MM, Preul C, Scheid R, Schmiedel O, Guthke T, and von Cramon DY. Spontaneous slow hemodynamic oscillations are impaired in cerebral microangiopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 1675-1684, 2005.

- 345. Sciurba F, Criner GJ, Lee SM, Mohsenifar Z, Shade D, Slivka W, and Wise RA. Six-minute walk distance in chronic obstructive pulmonary disease: reproducibility and effect of walking course layout and length. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 1522-1527, 2003.
- 346. Seakins M, Gibbs WN, Milner PF, and Bertles JF. Erythrocyte Hb-S concentration. An important factor in the low oxygen affinity of blood in sickle cell anemia. *J Clin Invest* 52: 422-432, 1973.
- 347. **Secomb TW**. Red blood cell mechanics and capillary blood rheology. *Cell Biophys* 18: 231-251, 1991.
- 348. Senturk UK, Gunduz F, Kuru O, Kocer G, Ozkaya YG, Yesilkaya A, Bor-Kucukatay M, Uyuklu M, Yalcin O, and Baskurt OK. Exercise-induced oxidative stress leads hemolysis in sedentary but not trained humans. *J Appl Physiol* 99: 1434-1441, 2005.
- 349. Serjeant GR, and Serjeant BE. *Sickle cell disease*. Oxford Medical Publications (Third Edition), 2001.
- 350. Setty BN, Stuart MJ, Dampier C, Brodecki D, and Allen JL. Hypoxaemia in sickle cell disease: biomarker modulation and relevance to pathophysiology. *Lancet* 362: 1450-1455, 2003.
- 351. Shepro D, and Morel NM. Pericyte physiology. FASEB J 7: 1031-1038, 1993.
- 352. Simmonds MJ, Minahan CL, Serre KR, Gass GC, Marshall-Gradisnik SM, Haseler LJ, and Sabapathy S. Preliminary findings in the heart rate variability and haemorheology response to varied frequency and duration of walking in women 65-74 yr with type 2 diabetes. *Clin Hemorheol Microcirc* 51: 87-99, 2012.
- 353. Slaaf DW, Tangelder GJ, Teirlinck HC, and Reneman RS. Arteriolar vasomotion and arterial pressure reduction in rabbit tenuissimus muscle. *Microvasc Res* 33: 71-80, 1987.

- 354. Slaaf DW, Vrielink HH, Tangelder GJ, and Reneman RS. Effective diameter as a determinant of local vascular resistance in presence of vasomotion. *Am J Physiol* 255: H1240-1243, 1988.
- 355. Smith TG, Ayi K, Serghides L, McAllister CD, and Kain KC. Innate immunity to malaria caused by Plasmodium falciparum. *Clin Invest Med* 25: 262-272, 2002.
- 356. Sobue K, Yamamoto N, Yoneda K, Hodgson ME, Yamashiro K, Tsuruoka N, Tsuda T, Katsuya H, Miura Y, Asai K, and Kato T. Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neurosci Res* 35: 155-164, 1999.
- 357. Soderstrom T, Stefanovska A, Veber M, and Svensson H. Involvement of sympathetic nerve activity in skin blood flow oscillations in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1638-1646, 2003.
- 358. Sriram K, Vazquez BY, Yalcin O, Johnson PC, Intaglietta M, and Tartakovsky DM. The effect of small changes in hematocrit on nitric oxide transport in arterioles. *Antioxid Redox Signal* 14: 175-185, 2010.
- 359. **Stefanovska A**. Coupled oscillators. Complex but not complicated cardiovascular and brain interactions. *IEEE Eng Med Biol Mag* 26: 25-29, 2007.
- 360. Stefanovska A, Bracic M, and Kvernmo HD. Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique. *IEEE Trans Biomed Eng* 46: 1230-1239, 1999.
- Stephenson LA, and Kolka MA. Plasma volume during heat stress and exercise in women. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 57: 373-381, 1988.
- 362. Stevens MC, Maude GH, Beckford M, Grandison Y, Mason K, Serjeant BE, Taylor B, Topley JM, and Serjeant GR. Haematological change in sickle cellhaemoglobin C disease and in sickle cell-beta thalassaemia: a cohort study from birth. *Br J Haematol* 60: 279-292, 1985.
- 363. **Streekstra GJ, Dobbe JG, and Hoekstra AG**. Quantification of the fraction poorly deformable red blood cells using ektacytometry. *Opt Express* 18: 14173-14182, 2010.
- 364. Strouse JJ, Cox CS, Melhem ER, Lu H, Kraut MA, Razumovsky A, Yohay K, van Zijl PC, and Casella JF. Inverse correlation between cerebral blood flow measured by continuous arterial spin-labeling (CASL) MRI and neurocognitive function in children with sickle cell anemia (SCA). *Blood* 108: 379-381, 2006.
- 365. **Stuehr DJ, Santolini J, Wang ZQ, Wei CC, and Adak S**. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J Biol Chem* 279: 36167-36170, 2004.

- Suzuki S, Takasaki S, Ozaki T, and Kobayashi Y. A tissue oxygenation monitor using NIR Spatially Resolved Spectroscopy. SPIE 3597: 582-592, 1999.
- 367. **Sykova E**. Extracellular K+ accumulation in the central nervous system. *Prog Biophys Mol Biol* 42: 135-189, 1983.
- 368. Tavakkoli F, Nahavandi M, Wyche MQ, and Castro O. Effects of hydroxyurea treatment on cerebral oxygenation in adult patients with sickle cell disease: an openlabel pilot study. *Clin Ther* 27: 1083-1088, 2005.
- 369. Thiriet P, Le Hesran JY, Wouassi D, Bitanga E, Gozal D, and Louis FJ. Sickle cell trait performance in a prolonged race at high altitude. *Med Sci Sports Exerc* 26: 914-918, 1994.
- 370. Thorn CE, Kyte H, Slaff DW, and Shore AC. An association between vasomotion and oxygen extraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H442-449, 2011.
- 371. **Tinti G, Somera R, Jr., Valente FM, and Domingos CR**. Benefits of kinesiotherapy and aquatic rehabilitation on sickle cell anemia. A case report. *Genet Mol Res* 9: 360-364, 2010.
- 372. **Traub O, and Berk BC**. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 677-685, 1998.
- 373. Tripette J. Porteur du trait drépanocytaire et exercice physique : anomalies hémorhéologiques et vasculaires. Pointe-à-Pitre: Université des Antilles et de la Guyane, 2008.
- 374. Tripette J, Alexy T, Hardy-Dessources MD, Mougenel D, Beltan E, Chalabi T, Chout R, Etienne-Julan M, Hue O, Meiselman HJ, and Connes P. 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* 94: 1060-1065, 2009.
- 375. Tripette J, Connes P, Beltan E, Chalabi T, Marlin L, Chout R, Baskurt OK, Hue O, and Hardy-Dessources MD. Red blood cell deformability and aggregation, cell adhesion molecules, oxidative stress and nitric oxide markers after a short term, submaximal, exercise in sickle cell trait carriers. *Clin Hemorheol Microcirc* 45: 39-52, 2010.
- 376. Tsai AG, Acero C, Nance PR, Cabrales P, Frangos JA, Buerk DG, and Intaglietta
 M. Elevated plasma viscosity in extreme hemodilution increases perivascular nitric oxide concentration and microvascular perfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1730-1739, 2005.

- 377. Tsai AG, Friesenecker B, McCarthy M, Sakai H, and Intaglietta M. Plasma viscosity regulates capillary perfusion during extreme hemodilution in hamster skinfold model. *Am J Physiol* 275: H2170-2180, 1998.
- 378. **Tsai AG, and Intaglietta M**. Evidence of flowmotion induced changes in local tissue oxygenation. *Int J Microcirc Clin Exp* 12: 75-88, 1993.
- 379. **Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, and Cooke JP**. Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation* 94: 1682-1689, 1996.
- 380. **Tuma RF**. The cerebral microcirculation. In: *Microcirculation (Second Edition)*, edited by Tuma RF, Duran WN, and Ley KElsevier, 2008.
- 381. **Tuma RF**. The cerebral microcirculation. In: *Comprehensive Physiology*Wiley online library, 2011, p. 485-520.
- 382. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, and Harrison DG. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol* 269: C1371-1378, 1995.
- 383. Valadi N, Silva GS, Bowman LS, Ramsingh D, Vicari P, Filho AC, Massaro AR, Kutlar A, Nichols FT, and Adams RJ. Transcranial Doppler ultrasonography in adults with sickle cell disease. *Neurology* 67: 572-574, 2006.
- 384. Van Beekvelt MC. Quantitative Near-infrared spectroscopy in human skeletal muscle: methodological issues and clinical application. In: *Department of Physiology*. Nijmegen (Netherlands): University medical Centre Nijmegen, 2002.
- 385. van Beekvelt MC, Borghuis MS, van Engelen BG, Wevers RA, and Colier WN. Adipose tissue thickness affects in vivo quantitative near-IR spectroscopy in human skeletal muscle. *Clin Sci (Lond)* 101: 21-28, 2001.
- 386. Van Beekvelt MC, Colier WN, Wevers RA, and Van Engelen BG. Performance of near-infrared spectroscopy in measuring local O(2) consumption and blood flow in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90: 511-519, 2001.
- 387. van Beers EJ, Nieuwdorp M, Duits AJ, Evers LM, Schnog JJ, and Biemond BJ. Sickle cell patients are characterized by a reduced glycocalyx volume. *Haematologica* 93: 307-308, 2008.
- 388. Van Lieshout JJ, Wieling W, Karemaker JM, and Secher NH. Syncope, cerebral perfusion, and oxygenation. *J Appl Physiol* 94: 833-848, 2003.
- 389. Vandewalle H, Lacombe C, Lelievre JC, and Poirot C. Blood viscosity after a 1-h submaximal exercise with and without drinking. *Int J Sports Med* 9: 104-107, 1988.

- 390. Varlet-Marie E, Gaudard A, Monnier JF, Micallef JP, Mercier J, Bressolle F, and Brun JF. Reduction of red blood cell disaggregability during submaximal exercise: relationship with fibrinogen levels. *Clin Hemorheol Microcirc* 28: 139-149, 2003.
- 391. Verduzco LA, and Nathan DG. Sickle cell disease and stroke. *Blood* 114: 5117-5125, 2009.
- 392. Verkeste CM, Boekkooi PF, Saxena PR, and Peeters LL. Increased red cell aggregation does not reduce uteroplacental blood flow in the awake, hemoconcentrated, late-pregnant guinea pig. *Pediatr Res* 31: 91-93, 1992.
- 393. Verlhac S, Bernaudin F, and Brugieres P. [Transcranial color Doppler in children with sickle cell disease]. *J Radiol* 84: 131-138, 2003.
- 394. Vetri F, Menicucci D, Lapi D, Gemignani A, and Colantuoni A. Pial arteriolar vasomotion changes during cortical activation in rats. *Neuroimage* 38: 25-33, 2007.
- 395. Veyckemans F, Baele P, Guillaume JE, Willems E, Robert A, and Clerbaux T. Hyperbilirubinemia does not interfere with hemoglobin saturation measured by pulse oximetry. *Anesthesiology* 70: 118-122, 1989.
- 396. Vicaut E, Hou X, Decuypere L, Taccoen A, and Duvelleroy M. Red blood cell aggregation and microcirculation in rat cremaster muscle. *Int J Microcirc Clin Exp* 14: 14-21, 1994.
- 397. Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, Nickerson B, Orringer E, McKie V, Bellevue R, Daeschner C, and Manci EA. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. N Engl J Med 342: 1855-1865, 2000.
- 398. Vichinsky EP, Neumayr LD, Gold JI, Weiner MW, Rule RR, Truran D, Kasten J, Eggleston B, Kesler K, McMahon L, Orringer EP, Harrington T, Kalinyak K, De Castro LM, Kutlar A, Rutherford CJ, Johnson C, Bessman JD, Jordan LB, and Armstrong FD. Neuropsychological dysfunction and neuroimaging abnormalities in neurologically intact adults with sickle cell anemia. *JAMA* 303: 1823-1831, 2010.
- 399. Vincent L, Feasson L, Oyono-Enguelle S, Banimbek V, Denis C, Guarneri C, Aufradet E, Monchanin G, Martin C, Gozal D, Dohbobga M, Wouassi D, Garet M, Thiriet P, and Messonnier L. Remodeling of skeletal muscle microvasculature in sickle cell trait and alpha-thalassemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H375-384, 2010.
- 400. Vink H, Constantinescu AA, and Spaan JA. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer : implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation* 101: 1500-1502, 2000.

- 401. **Vink H, and Duling BR**. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ Res* 79: 581-589, 1996.
- Vogiatzis I, Zakynthinos S, Boushel R, Athanasopoulos D, Guenette JA, Wagner H, Roussos C, and Wagner PD. The contribution of intrapulmonary shunts to the alveolar-to-arterial oxygen difference during exercise is very small. *J Physiol* 586: 2381-2391, 2008.
- 403. **Wasserman K, Whipp BJ, Koyl SN, and Beaver WL**. Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise. *J Appl Physiol* 35: 236-243, 1973.
- 404. Weatherall DJ, and Clegg JB. *The thalassaemia Syndromes (3rd edn)*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1981.
- 405. Wei L, Otsuka T, Acuff V, Bereczki D, Pettigrew K, Patlak C, and Fenstermacher J. The velocities of red cell and plasma flows through parenchymal microvessels of rat brain are decreased by pentobarbital. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 487-497, 1993.
- 406. Weinbaum S, Zhang X, Han Y, Vink H, and Cowin SC. Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7988-7995, 2003.
- 407. Weiss M, Milman B, Rosen B, Eisenstein Z, and Zimlichman R. Analysis of the diminished skin perfusion in elderly people by laser Doppler flowmetry. *Age Ageing* 21: 237-241, 1992.
- 408. Welsh M, Sharpe RM, Moffat L, Atanassova N, Saunders PT, Kilter S, Bergh A, and Smith LB. Androgen action via testicular arteriole smooth muscle cells is important for Leydig cell function, vasomotion and testicular fluid dynamics. *PLoS One* 5: e13632, 2010.
- 409. West JB, Tsukimoto K, Mathieu-Costello O, and Prediletto R. Stress failure in pulmonary capillaries. *J Appl Physiol* 70: 1731-1742, 1991.
- 410. Whittaker SR, and Winton FR. The apparent viscosity of blood flowing in the isolated hindlimb of the dog, and its variation with corpuscular concentration. *J Physiol* 78: 339-369, 1933.
- 411. Williams L, Fu Z, and Dulloor P. Identification of trhombospondin-1 and L-selectin as Potential plasma Biomarkers of Silent Cerebral Infract In Children with sickle cell diease using a proteomic-based approach. *Annual Meeting and Exposition* 2010.

- 412. Wong FY, Leung TS, Austin T, Wilkinson M, Meek JH, Wyatt JS, and Walker AM. Impaired autoregulation in preterm infants identified by using spatially resolved spectroscopy. *Pediatrics* 121: e604-611, 2008.
- 413. Wood SC, Doyle MP, and Appenzeller O. Effects of endurance training and long distance running on blood viscosity. *Med Sci Sports Exerc* 23: 1265-1269, 1991.
- 414. Woolsey TA, Rovainen CM, Cox SB, Henegar MH, Liang GE, Liu D, Moskalenko YE, Sui J, and Wei L. Neuronal units linked to microvascular modules in cerebral cortex: response elements for imaging the brain. *Cereb Cortex* 6: 647-660, 1996.
- 415. Wray S, Cope M, Delpy DT, Wyatt JS, and Reynolds EO. Characterization of the near infrared absorption spectra of cytochrome aa3 and haemoglobin for the non-invasive monitoring of cerebral oxygenation. *Biochim Biophys Acta* 933: 184-192, 1988.
- 416. Wun T, Paglieroni T, Tablin F, Welborn J, Nelson K, and Cheung A. Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. *J Lab Clin Med* 129: 507-516, 1997.
- 417. Yalcin O, Bor-Kucukatay M, Senturk UK, and Baskurt OK. Effects of swimming exercise on red blood cell rheology in trained and untrained rats. *J Appl Physiol* 88: 2074-2080, 2000.
- 418. Yalcin O, Erman A, Muratli S, Bor-Kucukatay M, and Baskurt OK. Time course of hemorheological alterations after heavy anaerobic exercise in untrained human subjects. *J Appl Physiol* 94: 997-1002, 2003.
- 419. Yalcin O, Uyuklu M, Armstrong JK, Meiselman HJ, and Baskurt OK. Graded alterations of RBC aggregation influence in vivo blood flow resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2644-2650, 2004.
- 420. **Yelderman M, and New W, Jr.** Evaluation of pulse oximetry. *Anesthesiology* 59: 349-352, 1983.
- 421. **Yoshitani K, Kawaguchi M, Miura N, Okuno T, Kanoda T, Ohnishi Y, and Kuro M**. Effects of hemoglobin concentration, skull thickness, and the area of the cerebrospinal fluid layer on near-infrared spectroscopy measurements. *Anesthesiology* 106: 458-462, 2007.
- 422. **Zaritsky JJ, Eckman DM, Wellman GC, Nelson MT, and Schwarz TL**. Targeted disruption of Kir2.1 and Kir2.2 genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K(+) current in K(+)-mediated vasodilation. *Circ Res* 87: 160-166, 2000.

- 423. Zauner A, Daugherty WP, Bullock MR, and Warner DS. Brain oxygenation and energy metabolism: part I-biological function and pathophysiology. *Neurosurgery* 51: 289-301; discussion 302, 2002.
- 424. **Zhang J, Johnson PC, and Popel AS**. Effects of erythrocyte deformability and aggregation on the cell free layer and apparent viscosity of microscopic blood flows. *Microvasc Res* 77: 265-272, 2009.
- 425. **Zhao J, Tian Y, Cao J, Jin L, and Ji L**. Mechanism of endurance training-induced erythrocyte deformability in rats involves erythropoiesis. *Clin Hemorheol Microcirc* 2012.
- 426. **Zlokovic BV**. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57: 178-201, 2008.
- 427. **Zlokovic BV**. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci* 28: 202-208, 2005.
- 428. **Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, and Carmignoto G**. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6: 43-50, 2003.
- 429. Zweifel C, Castellani G, Czosnyka M, Carrera E, Brady KM, Kirkpatrick PJ, Pickard JD, and Smielewski P. Continuous assessment of cerebral autoregulation with near-infrared spectroscopy in adults after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 41: 1963-1968, 2010.