THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ SAVOIE MONT BLANC
Spécialité : **Biologie et Physiologie de l'Exercice & Sciences de la Motricité**
Arrêté ministériel : 25 Mai 2016

Présentée par
Manon RICCETTI

Thèse dirigée par **Laurent MESSONNIER** et
codirigée par **Léonard FEASSON**

préparée au sein du **Laboratoire Interuniversitaire de la Biologie et Motricité (LIBM) du Bourget-du-Lac**
dans **l'École Doctorale SIE**

Répercussions de la drépanocytose en fonction du genre, d'un traitement médicamenteux et de l'entraînement en endurance sur le tissu musculaire, son phénotype et ses capacités métaboliques

Thèse soutenue publiquement le **19 décembre 2022,**
devant le jury composé de :

Mr Hervé DUBOUCHAUD
Université Grenoble Alpes, Grenoble, Rapporteur

Mme Nathalie BOISSEAU
Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, Rapporteure

Mme Alexandra HENRIONNET
IRBA, Université d'Evry, Évry-Courcouronnes, Examinatrice

Mr Cyril MARTIN
Université Claude Bernard, Lyon, Examinateur

Mr David BENDAHAN
Université Aix-Marseille, Marseille, Examinateur

Mr Laurent MESSONNIER
Université Savoie Mont Blanc, Le Bourget-du-Lac, Directeur

Mr Léonard FEASSON
Université Jean Monnet, Saint-Etienne, Co-Directeur

THÈSE DE SCIENCES

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ SAVOIE MONT BLANC

Spécialité : **Biologie et Physiologie de l'Exercice & Sciences de la Motricité**

Arrêté ministériel : 25 Mai 2016

Présentée par **Manon RICCETTI**

Thèse dirigée par **Laurent MESSONNIER** et

codirigée par **Léonard FEASSON**

préparée au sein du **Laboratoire Interuniversitaire de la Biologie et Motricité (LIBM) du Bourget-du-Lac** dans **l'École Doctorale SIE**

Répercussions de la drépanocytose en fonction du genre, d'un traitement médicamenteux et de l'entraînement en endurance sur le tissu musculaire, son phénotype et ses capacités métaboliques.

Thèse soutenue publiquement le **19 décembre 2022,** devant le jury composé de :

Mr Hervé DUBOUCHAUD, Université Grenoble Alpes, Grenoble	Rapporteur
Mme Nathalie BOISSEAU, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand	Rapporteure
Mme Alexandra HENRIONNET, IRBA, Université d'Evry**,** Évry-Courcouronnes	Examinatrice
Mr Cyril MARTIN, Université Claude Bernard, Lyon	Examinateur
Mr David BENDAHAN, Université Aix-Marseille, Marseille	Examinateur
Mr Laurent MESSONNIER, Université Savoie Mont Blanc, Le Bourget-du-lac	Directeur
Mr Léonard FEASSON, Université Jean Monnet, Saint-Etienne	Co-Directeur

REMERCIEMENTS

Partie très délicate pour moi puisque je ne saurai par où et par qui commencer…
Peut-être par la base, Laurent, merci. Merci de m'avoir laissé ma chance en me choisissant comme candidate pour ce projet de thèse, merci de m'avoir fait confiance alors que je n'avais jamais touché une pipette et jamais exploité une paillasse de ma vie (si ce n'est qu'au collège pour disséquer une souris en SVT !). Quand j'ai candidaté en 2018 j'étais bien loin de m'imaginer que vous me rappelleriez en 2019 pour postuler à nouveau sur un autre projet de thèse. Pourtant, ces trois ans n'ont pas toujours été facile pour moi avec énormément de remises en question. Je me suis souvent demandée si j'étais bien à ma place en doctorat et plus d'une fois, dans nos discussions, vous m'avez fait comprendre qu'on avait tous des qualités à exploiter et à mettre au profit de notre projet. Vous m'avez fait confiance en me laissant de l'autonomie, j'ai pu organiser mes différentes expérimentations comme je le souhaitais, j'ai toujours pu avancer à mon rythme. Vous m'avez aussi laissé gérer l'organisation de mon planning au sein du laboratoire, permis du télétravail qui m'a lui-même permis de m'entraîner comme je le voulais et cumuler trois années de doctorat avec trois années de réussite sportive, jusqu'à me qualifier aux Championnats du Monde de 70.3 à Saint George dans l'Utah. Oui, acharnée de travail, j'ai réussi à m'épanouir autant au travail que sur le plan athlétique et ce n'était pas arrivé depuis mes 20 années d'athlétisme. La rigueur de la thèse et la rigueur que vous m'avez imposée m'a permis de sortir de mes retranchements, repousser les limites de mon corps mais aussi et surtout, de mon esprit. Je pense sincèrement que ces années de thèse, encadrées par vos soins, m'ont fait davantage grandir. Comme on dirait à l'athlétisme, j'ai forgé le mental ! Alors pour tout ça, merci.

Merci à Léonard, mon co-directeur, pour m'avoir logée comme une princesse lors de mes venues à Saint-Etienne (et à Sévérine, d'une gentillesse et d'une écoute remarquables. Sans oublier les deux chiens, les deux chats, et les deux chevaux évidemment. On reconnait mon amour pour les animaux !). Pour les nombreuses discussions que l'on a eu notamment sur l'Italie, l'athlétisme, le triathlon, les compétitions et mes objectifs tordus. Pour les run que l'on a partagé ensemble dans les montagnes de Saint-Chamond, et les kudos sur Strava. Pour m'avoir aussi appris à faire des coupes sur les biopsies musculaires et à faire des analyses immunohistologique. D'ailleurs, merci à Dominique, Kévin et Carole pour toutes les lames dont vous vous êtes gentiment et soigneusement occupées, sans vous j'y serai encore !

Une mention spéciale à Benjamin Chatel. Toi, qui m'as tout appris du Western Blot, qui a toujours su répondre à mes multiples questions, qui a su trouver les mots quand je désespérais parce que ça ne marchait pas, qui a su m'écouter plus d'une fois. J'ai apprécié partager la paillasse avec toi pendant les restrictions Covid ! Je te l'écris en toute honnêteté, je t'ai vraiment regretté quand tu es parti. J'ai commencé ma première année de thèse avec un encadrement vraiment inoubliable, je me suis initiée au jeun de 24h grâce à toi aussi et ça à beaucoup joué sur ma préparation sportive (positivement, bien-sûr). Souvent on me charriait parce que je ne jugeais que par toi quand j'avais un exemple à donner, mais il faut le dire tu m'as été d'un exemple remarquable et ce, jusqu'à la fin de ma thèse ! Evidemment, qui dit Benjamin dit aussi Jérémy. Monsieur Delabre, un ami au cœur sur la main sur qui j'ai toujours pu compter aussi, dans le travail comme dans la vie de tous les jours. Je pense à tous les repas que l'on a passé ensemble, assis sur les trottoirs du parking parce que la cafétéria était interdite avec les restrictions Covid ! Je nous vois encore pester. Oui, parce que je pense que nos deux caractères de cochons matchaient à 100% pour râler en symphonie, commenter les actions des gens qui nous entourent, du bien et du mal, et pour finalement discuter de la vie en toute philosophie. Merci, pour tous tes conseils, ta patience et ton oreille attentive. Je t'ai regretté aussi quand tu es parti, tu étais un pilier pour moi au laboratoire et je suis sincèrement ravie de t'avoir rencontré et de te compter parmi mes amis aujourd'hui.

Mention spéciale aussi à Constance Michel, en thèse en même temps que moi mais à Marseille. Notre relation est spéciale. Je n'étais qu'une simple doctorante qui récupérait les muscles de tes souris pour en faire des mélanges bizarres et désormais, je sais que je peux compter sur toi. A nos nombreux SMS échangés quand on était au fond du sceau, à nos nombreux appels téléphoniques pour blablater sur nos vies, nos hobbies, nos ambitions professionnelles et personnelles. Tu as été un vrai soutien pour moi, sache-le, et je suis très fière d'être diplômée en cette fin d'année en même temps que toi ! Merci à Phanélie. Tu es un exemple de vie, sincèrement je suis fière de t'avoir eu sur mon chemin. Merci pour tes nombreuses aides lors des expérimentations, surtout pour celles d'enzymologie alors que je n'avais absolument aucune motivation. Merci pour toutes les connaissances que tu m'as apportées, merci pour ton humanité, ton écoute et tes partages. Merci à Manon Rojo. Pour ton aide incontestable lors des différentes expérimentations que j'ai dû réaliser : les Western Blot, la découpe de muscles, l'enzymologie, l'histologie, les gammes de protéines et j'en passe. On s'est fait mutuellement confiance et ça nous a permis d'avancer. Je suis très heureuse pour toi que tu sois à ton tour en thèse, tu le mérites !

Mathilde, ma meilleure amie. Tu me suis toujours dans mes folies, notamment sur mes Half Iron-man. Tu es ma fidèle supportrice tant bien sur le plan sportif que dans ce Doctorat. Pour ça, merci. Merci de croire en moi et de me faire croire en moi, toutes les fois où j'ai pourtant douté. Merci à Oriane, là, pour ainsi dire depuis toujours. Tu as sans doute été une de mes motivations pour me lancer dans une thèse de doctorat. Toi, si brillante. Tu as été un exemple pour moi. J'ai été submergée d'une énorme fierté et de beaucoup d'émotions quand j'ai assisté à ta soutenance à Lausanne en juillet dernier. Merci pour toutes les discussions que l'on a eues à ce sujet et évidemment pour tous les conseils que tu m'as apportés. Pour le reste, tu sais tout, tu es mon tout, depuis 20 ans.

Danièle et Georges, mes deux voisins qui ont suivis ces trois années de près, en me questionnant souvent sur mes projets avec beaucoup d'intérêts, en m'encourageant et en étant souvent « fiers d'être nos voisins ». Anne-Laure, ma bichette qui croit toujours en moi qui m'a aussi suivi pendant ces trois années. Merci Covid, notamment pour les nombreux après-midis au soleil dans le jardin, tandis que je lisais mes articles scientifiques et toi, tes bouquins. De beaux moments de partages. Marilou, ma copine du vélo qui a su m'aérer l'esprit durant nos entraînements de la pause déjeuner, qui a suivi mes péripéties toujours de très près et qui a toujours été l'oreille attentive, digne d'une amie. Aurélie, incontestable soutien de toute ma vie entière, mon scorpion préféré qui a toujours su trouver les mots tandis que tu étais souvent dans la même panade que moi. Chloé, qui a surtout suivi ma dernière année de thèse, qui m'a diverti sur du Kim Petras et qui m'a fait passer le cap de muter à Aix, très important pour assurer mes derniers mois d'écriture ! Merci à ma poulette Camille, une amie en or qui m'a suivi aussi et non pas que sur mes compétitions mais de manière générale, dans mes projets de vie. Merci à Claire ma ratatouille, Léo et Sacha ma noisette, vous êtes mes meilleurs amis, mes meilleurs confidents à qui j'ai apprécié partager mes péripéties, avec qui j'ai apprécié partager des moments de vie intenses qui m'ont toujours fait prendre conscience de la chance que j'avais de vous avoir. Loin des yeux, toujours près du cœur. STAPS fait faire de magnifiques rencontres.

Merci à mes trois collègues de bureau pour la dernière année, Caroline, Mathieu et Brice ; on a tellement ri, avec nos expressions à coucher dehors. Caro, au caractère finalement si semblable au mien, avec qui j'ai échangé sur des sujets divers et variés. Mathieu la guinéenne, j'ai été ravie d'avoir été cobaye de tes tests d'expérimentations, de m'être retournée au bruit du carbone en même temps que toi et je ne t'en veux pas de m'avoir souvent martyrisé, j'espère que les autres vont désormais s'en charger ! Merci à Brice, et c'est un peu délicat de l'écrire sur ce

manuscrit mais je te cris haut et fort un mot de 4 lettres, toi-même tu sais ? Un mot qui résume nos nombreux fous rires, de quoi me mettre du baume au cœur. Merci à JB pour nos nombreuses discussions, tu as été un soutien moral pour moi surtout en cette fin de thèse, tu es une formidable personne et par conséquent un formidable papa. Merci à Yann pour ces longues discussions philosophiques et ton oreille attentive. Merci également à Marie Chenavard pour les nombreuses discussions que l'on a eu autour de notre paillasse. Je te souhaite sincèrement le meilleure et surtout que tu t'épanouisses dans ta future vie professionnelle. Merci à Léo Blervaque et à Angèle Merlet pour les conseils précieux lors de l'écriture de mes articles et le traitement de mes données. Merci à Telma, Hervé, Clément, Mickael, Max, Baptiste, Pierre, Fred, les collègues du couloir avec qui j'ai échangé et surtout avec qui j'ai mangé de fabuleux Kebab, important pour tenir une journée ! Mention spéciale aussi à Patricia et Bernard, deux personnes formidables que je n'oublierai jamais.

David, mon frère. Le sang. J'écris ces mots avec beaucoup d'émotions. Sache que je suis très fière de toi, de ce que tu es et de comment tu te bats dans ta vie pour essayer de faire de ton handicap une réelle force. Tu as aussi suivi mes péripéties lors de ces trois années de thèse, tu m'as toujours été d'un soutien incontestable, et pour tout de manière générale, et ça, c'est à la vie à la mort ! Merci à mes parents. Papa, je me rappelle encore de nos longues discussions quand je t'ai dit que je voulais faire STAPS. Tu étais inquiet pour moi, tu avais peur que je n'aie aucune débouchée. Je me rappelle aussi de cette grande fierté dans tes yeux quand je t'ai dit que j'étais prise en thèse. Cette fierté que je retrouve aussi lors de mes compétitions. Oui Papa, je l'aurai cette thèse, oui Papa je vais être Docteur et sache Papa, que ta fille est super fière aussi de ce que tu es. Maman, tu n'as pas toujours compris ce que je fabriquais vraiment dans ma thèse. Ma vulgarisation scientifique n'était sans doute pas assez optimale pourtant, tu m'as toujours soutenue, écoutée, et conseillée. A tes nombreux messages de bonne nuit que je recevais tandis que j'avais les yeux rivés sur l'écran, tes petits cœurs et tes réels sur Instagram qui me mettaient du baume au cœur. Merci d'être toi et de l'avoir été durant ces trois années de thèse, tu peux aussi être fière de ce que tu as accompli, toi même tu sais. Merci à mes grands-parents, ma belle-famille, grazie a Maria, la Zia. Mia famiglia d'Italia. E una soddisfazione per me di vedervi essere orgogliose di me. Saremo lontani dei iocchi ma mai del cuore.

Hervé Assadi mon entraîneur qui m'a suivi de loin (mais de près quand même !) avec beaucoup d'intérêt. Nicolas Babault, mon super encadrant de Master qui m'a toujours demandé des nouvelles et qui m'a toujours encouragé. Merci à mon ancien club de Dijon le DUC Athlé qui

m’a permis de partager de fabuleux moments avec les filles lors des différents Championnats, des moments importants qui m’auront permis de m’aérer l’esprit.

Je citerais encore mon gros Lulu et Eloise, Dom Pozzo, Arnaud Mary, ma cousine Elodie comme ma sœur, Zoé Dolle, J-B Sauvage, Rudy, Roro, Chloé ma cochonette, Enzo l’Momo, ma Madie, Francesca, mon Double Arthur, Ben et Fab’, Alexis et Romain, vous comptez beaucoup pour moi et je suis très heureuse de vous avoir dans ma vie. J’espère n’avoir oublié personne. D’un naturel émotif, je remercie tous ceux qui ont été sur mon chemin durant ces trois années et qui m’auront apporté du bien, quel qu’il soit, sur le plan professionnel (à l’Université, à la fac ou à travers mon statut d’auto entrepreneur) ou dans le sport (mes concurrents, mes coachés, mes coéquipiers).

Merci aux différents membres d’avoir accepté de faire partie de mon jury, pour la patience et la confiance accordées : Mr Hervé Dubouchaud, Mme Nathalie Boisseau, Mme Alexandra Henrionnet, Mr Cyril Martin et Mr David Bendahan.

Et enfin, je tiens à finir mes longs remerciements en remerciant celui qui partage ma vie depuis 11 ans, bientôt 12, mon Max, ma Pitch, mon Maxime (sans oublier Nemo notre fils-chat évidemment !). Durant toutes ces années, nous avons grandis ensemble. Pourtant pas du tout dans la même branche professionnelle, nous nous sommes toujours complétés. Tu n’as pas toujours tout compris quand je te parlais de mes expérimentations, tu n’as pas toujours saisi ce que je faisais quand tu regardais mon écran d’ordinateur, tu n’as jamais vraiment intégré la totalité de mon sujet de thèse mais comme tu dirais, je n’ai moi-même jamais su intégrer comment cuire un poisson et faire des sauces (oui, chacun son truc !). Dans tout ça, tu m’as toujours soutenu. N’oublions pas cette longue période de Covid et de confinement pendant laquelle je squattais le salon avec mon ordinateur, mes visio-conférences, ma pile de documents… et surtout, mon pessimisme, et ma nervosité. Tu as toujours été là. D’un naturel pudique, tu as toujours su me motiver non pas par les mots mais par les intentions, tu as toujours fait en sorte que j’aille de l’avant et que je solutionne chacun de mes problèmes. Merci pour les nombreux cafés que tu m’auras apporté durant cette période, merci de t’être mis à la course à pied (t’es le big-boss maintenant et je suis si fière de t’entraîner et de t’accompagner dans tes nouveaux défis) et surtout, merci pour ta patience, merci d’être toi.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX 17

LISTE DES ABREVIATIONS 19

AVANT-PROPOS 21

REVUE DE LITTERATURE 23

Chapitre 1 : La drépanocytose 23

I. Généralités 23

1) Historique 23

2) Génétique 24

3) Epidémiologie 26

4) Mutation et paludisme 27

5) Diagnostic 29

II. Caractéristiques pathologiques de la drépanocytose 29

1) L'hémoglobine et ses sous-unités 29

2) L'hémoglobine dans la drépanocytose 31

3) Polymérisation de l'hémoglobine S 31

4) Conséquences physiopathologiques de la faucille 32

a) Les crises vaso-occlusives (CVOs) 33

b) Le syndrome thoracique aigu (STA) 34

c) Les anémies hémolytiques sévères 35

III. Facteurs de risques associés à la drépanocytose 36

1) Hypoxie, hyperthermie et déshydratation 36

2) Acidose 36

3) Syndrome métabolique (SM) 38

4) Obésité viscérale 39

IV. Les différences entre les hommes et les femmes drépanocytaires 39

1) Hémoglobine fœtale et répercussions cliniques 40

2) Biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO) 41

3) *Hormones sexuelles et changements hormonaux* 41

V. Prise en charge et traitements de la drépanocytose 42

1) Echanges transfusionnels 42

2) L'hydroxyurée (HU) 43

3) Greffe de moelle osseuse 43

4) Voxelotor (GBT440) 44

5) Crizanlizumab 45

6) Autres traitements 45

Chapitre 2 : L'hydroxyurée (HU) 47

I. Généralités 47

II. Modalités de prise de l'hydroxyurée (HU) 48

III. Tolérance de l'hydroxyurée (HU) 48

1) Impact à court terme 49

2) Impact à long terme 49

a) Fertilité et grossesse 49

b) Mutagénicité et cancérogénicité 50

c) Des risques chez les enfants 50

IV. Efficacité de l'hydroxyurée (HU) 50

1) Les bénéfices et les effets biologiques 50

a) Impact sur l'hémoglobine fœtale (HbF) 51

b) Impact sur la ménopause chez les femmes 52

c) Une augmentation des taux d'hémoglobine et des valeurs d'hématocrite 52

d) Baisse de l'hémolyse 53

e) Impact sur l'oxyde nitrique (NO) 53

f) Effets sur la masse corporelle 53

g) Impact sur les performances physiques 54

h) Des effets à long et court terme sur l'oxygénation cérébrale 56

2) Effets de l'hydroxyurée chez les enfants drépanocytaires 56

Chapitre 3 : Le muscle strié squelettique 57

I. Généralités sur le muscle strié squelettique 57

1) Rappel sur l'architecture structurale du muscle strié squelettique 57

2) Rappels sur le réseau microvasculaire du muscle strié squelettique 60

3) Rappel des caractéristiques énergétiques du muscle strié squelettique 63

a) Filière anaérobie alactique 63

b) Filière anaérobie lactique 64

c) La voie aérobie 65

d) Utilisation des substrats à l'exercice 69

II. Régulation du pH dans le muscle squelettique 70

1) Le devenir de l'acide lactique 70

2) Mécanismes tampons intracellulaires 71

a) Le dipeptide et ses composés 71

b) Mécanismes dépendants du bicarbonate et anhydrases carboniques (CAII et CAIII) 71

3) Mécanismes de transport 72

a) Transporteur aux monocarboxylates (MCTs) 72

b) L''échangeur Na^+/H^+ (NHE1, ou SLC9A1) 74

4) Mécanismes tampons extracellulaires (CAIV et CAXIV) 75

III. Répercussions de la drépanocytose sur le muscle strié squelettique 76

1) Remodelage microvasculaire 76

a) Raréfaction du réseau capillaire 76

b) Moindre tortuosité des micro vaisseaux 77

2) Remodelage structural 77

3) Remodelage énergétique 78

Chapitre 4 : Effet de l'entraînement sur le remodelage musculaire, sur l'aptitude et qualité de vie des patients 81

I. Aptitude et qualité de vie : quels impacts ? 81

1) Cercle vicieux et sédentarité 81

2) Complications pour des efforts du quotidien 82

3) Impact sur les relations sociales 83

II. Les risques liés à l'entraînement en endurance chez les patients SCD 83

1) Acidose métabolique 84

a) Diminution du pH musculaire 84

b) Accumulation de H^+ de grande ampleur 84

2) Anomalies d'adaptations à l'effort 85

III. Les bienfaits de l'entraînement en endurance 85

1) Impact sur le système cardiaque 86

2) Impact sur le système respiratoire 86

3) Impact sur les muscles squelettiques 87

4) Impact sur la santé mentale et la cognition 88

5) Des bénéfices retrouvés chez les patients pathologiques 88

a) Maladies cardiaques 88

b) Diabète de type II, résistance à l'insuline et obésité 89

IV. Impact de l'entraînement chez les patients drépanocytaires 90

1) Remodelage microvasculaire 90

2) Bénéfices structuraux et énergétiques 91

3) Impact de l'entraînement en endurance sur le potentiel régénératif 92

4) Impact de l'entraînement en endurance sur la fonction musculaire et les réponses physiologiques à l'exercice des patients SCD 93

5) Cas des sujets porteurs du trait drépanocytaire 93

V. L'entraînement en endurance comme stratégie thérapeutique 94

1) Des études sur les enfants prometteuses 95

2) Type d'entraînement et récurrence 95

Chapitre 5 : Les modèles murins dans la drépanocytose 97

1) La souris SAD 97

a) Hématologie 98

b) Différents dommages notables 98

2) Le modèle de souris BERK 99

3) La NY1DD 99

4) Les souris S+S-Antilles 100

I. Le modèle de souris Townes 100

1) Particularité de la souris Townes 100

2) Hématologie, hémorhéologie et stress oxydant 101

3) Différents dommages notables 102

4) Comparaison mâles et femelles chez les souris Townes 103

5) L'entraînement physique chez les souris Townes 103

OBJECTIFS ET HYPOTHESES DE RECHERCHE 107

Objectifs de la thèse 107

ETUDE 1 : Etude des caractéristiques microvasculaires, structurales et énergétiques du muscle *vastus lateralis* de sujets féminins et masculins, sains (CON), SCT et SCD. 111

ETUDE 2 : Etude des effets de l'entraînement en endurance chez les patients SCD sur la pente de la relation $\dot{V}O_2$/puissance et leur flexibilité métabolique. 139

ETUDE 3 : Limites du modèle murin dans le remodelage du muscle strié squelettique : étude de physiologie comparée entre humains et souris (modèle Townes) CON, SCT et SCD. 165

ETUDE 4 : Influence de l'HU sur les caractéristiques microvasculaires, structurales et énergétiques du muscle strié squelettique de souris Townes SCD. 189

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 209

REFERENCES 213

ANNEXES 259

Publications et communications 259

Publications de revues scientifiques 259

Vulgarisation scientifique 260

Congrès Internationaux 260

Fiches méthodologiques 260

PROTOCOLE D'EXTRACTION POUR DOSAGE ENZYMATIQUE 273

SPECTROPHOTOMETRIE : ENOLASE 275

SPECTROPHOTOMETRIE : LACTATE DESHYDROGENASE 277

SPECTROPHOTOMETRIE : CITRATE SYNTHASE 279

SPECTROPHOTOMETRIE : MYOKINASE & 280

CREATINE KINASE 281

PROTOCOLE D'EXTRACTION POUR WESTERN BLOT 282

WESTERN BLOT 285

PROTOCOLE IMMUNO-HISTOLOGIE CD31 287

RESUME 289

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

FIGURE 1 : MODE DE TRANSMISSION AUTOSOMIQUE RECESSIF DE LA DREPANOCYTOSE. 25
FIGURE 2 : NOMBRE DE NOUVEAU-NES ATTEINTS D'ANEMIE FALCIFORME EN 2015 (PIEL ET AL., 2017). 26
FIGURE 3 : ESTIMATION DES MIGRATIONS NETTES D'INDIVIDUS AVEC HBS AU NIVEAU DU PAYS EN 2000. 27
FIGURE 4 : CARTE DE LA DISTRIBUTION GLOBALE DE LA DREPANOCYTOSE ET L'ENDEMICITE DU PALUDISME (PIEL ET AL., 2010). 28
FIGURE 5 : CONSTITUTION D'UNE MOLECULE D'HEMOGLOBINE (HB). 30
FIGURE 6 : COMPOSITION D'UN ERYTHROCYTE NORMAL ET D'UN ERYTHROCYTE EN FAUCILLE. 31
FIGURE 7 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES ETAPES INTERVENANT DANS LA GENESE DES CVO. D'APRES (FRENETTE, 2002). 34
FIGURE 8 : EFFET BOHR, EFFET DU PH SUR LA COURBE DE DISSOCIATION DE L'OXYHEMOGLOBINE (SCHMIDT-NIELSEN 1997) 38
FIGURE 9 : ROLE MAJEUR DU NO DANS LA DREPANOCYTOSE (GLADWIN ET AL., 2003). 41
FIGURE 10 : SCHEMA DE L'ACTION MULTIMODALE SUR LA SCD (MATTE ET AL., 2019). 51
FIGURE 11 : CHANGEMENTS DANS LES REPONSES DE PUISSANCE ANAEROBIE AU TEST « WINGATE » POUR LES SUJETS TRAITES PAR HU ET PLACEBO AU COURS DES 18 MOIS DE L'ETUDE (HACKNEY ET AL., 1997). 55
FIGURE 12 : ORGANISATION TISSULAIRE DU MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE. 57
FIGURE 13 : DETAILS DU SARCOMERE. 58
TABLEAU 14 : CARACTERISTIQUES CONTRACTILES, METABOLIQUES ET MORPHOLOGIQUES MOYENNES DES DIFFERENTS TYPES DE FIBRES DU MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE CHEZ L'HOMME. D'APRES (EGAN & ZIERATH, 2013). 60
FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ARCHITECTURE VASCULAIRE DU MUSCLE. 61
FIGURE 16 : HYDROLYSE DE L'ATP (CAMPBELL ET AL., 2009). 63
FIGURE 17 : LES 10 REACTIONS ENZYMATIQUES DE LA VOIE ANAEROBIE LACTIQUE DE LA GLYCOGENOLYSE ET DE LA GLYCOLYSE. 65
FIGURE 18 : LES 10 ETAPES DU CYCLE DE KREBS. 66
FIGURE 19 : SCHEMA DE LA B-OXYDATION. SCHEMA EXTRAIT DE LA THESE DE CHATEL (2017). 67
FIGURE 20 : SCHEMA DE LA CHAINE RESPIRATOIRE. 68
FIGURE 21 : SCHEMA DES DIFFERENTS ELEMENTS IMPLIQUES DANS LA REGULATION DU PH MUSCULAIRE. 75
FIGURE 22 : CAPILLARY OUTER DIAMETER (COD, µM). 76
FIGURE 23 : CARACTERISTIQUES ENERGETIQUES MUSCULAIRES. D'APRES RAVELOJAONA ET AL, 2015. 79
FIGURE 24 : LE CERCLE VICIEUX DES REPERCUSSIONS DE LA SCD SUR LE MUSCLE SQUELETTIQUE STRIE, CONDUISANT A UN PROFOND REMODELAGE ET DECONDITIONNEMENT MUSCULAIRE, ET PAR CONSEQUENT A UNE MAUVAISE QUALITE DE VIE. 82
FIGURE 25 : IMAGES REPRESENTATIVES DE LA CAPILLARISATION DU VASTE LATERAL APRES COLORATION POUR LE MARQUEUR ENDOTHELIAL CD31, CHEZ UN PATIENT ATTEINT DE MALADIE PULMONAIRE OBSTRUCTIVE CHRONIQUE (COPD) ET UN SUJET SAIN SEDENTAIRE (SHS) AVANT (RANGEE SUPERIEURE) ET APRES (RANGEE INFERIEUR) L'EXERCICE. D'APRES (GOUZI ET AL., 2013). 89
FIGURE 26 : (C) VARIATION EN % DES ACTIVITES ENZYMATIQUES DANS LE GROUPE ENTRAINE ET NON-ENTRAINE. (D) VARIATION EN % DE L'ACTIVITE DES FIBRES COX DANS LE GROUPE ENTRAINE ET NON-ENTRAINE. EXTRAIT DE (MERLET ET AL., 2020). 91
FIGURE 27 : EFFETS DE L'ENTRAINEMENT PHYSIQUE D'ENDURANCE SUR LA SURFACE DE FIBRE MUSCULAIRE PENDANT L'ENTRAINEMENT PAR RAPPORT AUX PATIENTS NON ENTRAINES. EXTRAIT DE (JANUEL ET AL., 2022). 92
FIGURE 28 : SCHEMA DU CERCLE VICIEUX AU CERCLE VERTUEUX PROPOSE PAR MERLET (2019) : BENEFICES LIES A LA PRATIQUE D'UNE ACTIVITE PHYSIQUE ADAPTEE CHEZ LE PATIENT DREPANOCYTAIRE. 96
FIGURE 29 : CONSTRUCTION DES GENES A- ET B-GLOBINE UTILISES POUR GENERER LA SOURIS SAD. 97
FIGURE 30 : CONSTRUCTION DES GENES A-, B- ET Γ-GLOBINES DE LA SOURIS TOWNES. D'APRES LA THESE DE E. CHARRIN (2017). 101
TABLEAU 31 : RECAPITULATIF DES SIMILITUDES ET DIFFERENCES ENTRE LES CARACTERISTIQUES DES MODELES MURINS ET DE L'HOMME, EXTRAIT DE LA THESE DE EMILIE CHARRIN, 2017. 105

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine diphosphate
ATP : adénosine triphosphate
β-HAD : β-hydroxyl-acyl-déshydrogénase
BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive
BSA : albumine de sérum bovin
C/F : capillary to fiber ratio
CA : anhydrase carbonique
CAF : nombre de capillaires au contact d'une fibre musculaire
CAFA : CAF/surface de la fibre musculaire
CapTor : tortuosité Capillaire
CAT : catalase
CD : densité capillaire
CI : complexe I de la chaine respiratoire
CII : complexe II de la chaine respiratoire
CIII : complexe III de la chaine respiratoire
CIV : complexe IV de la chaine respiratoire
CK : créatine kinase
CO_2 : dioxyde de carbone
CoA : coenzyme-A
CON : sujet témoin, sain
COx : cytochrome c oxydase
CSA : aire de la section transverse du muscle
CS : citrate synthase
CV : complexe V de la chaine respiratoire
CVO : crise vaso-occlusive
ENO : énolase
GR : globule rouge
GRX : glutaredoxine
H^+ : proton
H_2O : molécule d'eau
Hb : hémoglobine
HbA : hémoglobine saine
HbF : hémoglobine fœtale
HbS : hémoglobine mutée pour la drépanocytose
HbAA : porteur d'une hémoglobine normale
HbAS : hétérozygote pour la drépanocytose
HbSS : homozygote pour la drépanocytose
HK : hexokinase
LC : longueur des capillaires au contact d'une fibre
LC/PF : longueur des capillaires au contact d'une fibre/périmètre de la fibre
LDH : lactate déshydrogénase
MCHC : Mean corpuscular hemoglobin concentration pour concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
MCT : transporteur de monocarboxylate
MK : myokinase
Na^+ : ion sodium
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NAD^+ : nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NBC : co-transporteur sodium/bicarbonate
NHE1 : échange sodium/hydrogène 1
NO : nitric oxide, pour oxyde nitrique
O_2 : dioxygène
PFK : phosphofructokinase
ROS : espèces réactives oxygénées
SOD : superoxyde dismutase
SCD : Sickle Cell Disease
SDH : succinate déshydrogénase
SCT : Sickle Cell Trait, sujet porteur du trait
TBS : tris-buffered
VO_2max : consommation maximale en oxygène

AVANT-PROPOS

La drépanocytose (SCD) est une maladie génétique qui s'est répandue au-delà de ses origines géographiques (Afrique sub-saharienne et Inde principalement), en France et partout dans le monde, et est devenue un problème majeur de Santé publique avec environ 5 millions de personnes atteintes. Elle résulte d'une mutation unique au niveau d'un gène codant pour la chaine β-globine, aboutissant à la synthèse d'une hémoglobine S anormale (HbS). En condition désoxygénée, l'HbS polymérise provoquant la falciformation des globules rouges (GRs). Ceux-ci deviennent rigides, fragiles et s'enclavent dans les micro-vaisseaux sanguins. Les principales manifestations cliniques de la maladie sont une anémie hémolytique sévère et des crises vaso-occlusives (CVO) pouvant parfois être mortelles. Une activité physique trop intense chez les personnes atteintes de drépanocytose peut engendrer une acidose métabolique favorisant la polymérisation de l'hémoglobine. Environ 30% des CVO sont liées à un effort trop intense. Par précaution, les patients drépanocytaires (SCD) sont sédentaires (peu actifs physiquement) les plongeant dans un cercle vicieux, entraînant déconditionnement musculaire, diminuant leur aptitude physique et aggravant leur sédentarité.

Si la littérature décrit très bien la faible aptitude physique des patients et des anomalies d'adaptations à l'exercice physique (notamment un plus faible coefficient de pente de la relation $\dot{V}O_2$/puissance et une élévation précoce et rapide du lactate sanguin) de récentes études ont mis en évidence les effets bénéfiques d'un entraînement en endurance d'intensité modérée chez des patients SCD et ont montré que les caractéristiques musculaires, structurales, énergétiques et fonctionnelles du muscle s'adaptaient à l'entraînement physique de manière assez similaire à celles de sujets sains : amélioration de l'apport d'oxygène, bénéfices microvasculaires, et augmentation des enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif. En revanche, aucune étude ne s'est intéressée aux effets de l'entraînement en endurance sur la pente de la relation $\dot{V}O_2$/puissance et la flexibilité métabolique (capacité de l'organisme à utiliser des nutriments en fonction de leurs exigences fonctionnelle) des patients SCD.

La littérature montre également des différences physiologiques entre les sexes chez les sujets sains, notamment pour expliquer les différences de performance dans les sports. Dans la drépanocytose, des différences physiopathologiques/cliniques entre les deux sexes ont aussi été révélées. Les femmes drépanocytaires semblent moins fragiles que les hommes drépanocytaires sur certains aspects cliniques (maladies infectieuses, rénales ou cardiovasculaires, taux de

douleur ou de crises plus faible que chez les hommes) mais à ce jour, l'étude de cette différence n'est au final que très peu documentée dans la littérature.

Pour répondre à différents questionnements fondamentaux, un modèle murin de la drépanocytose, la souris Townes SCD, a été développé. Il s'agit actuellement du modèle murin avec la physiopathologie la plus proche de celle observée chez l'homme SCD. Toutefois aucune étude n'a à ce jour comparé le remodelage musculaire présent chez les patients SCD avec les mêmes caractéristiques déterminées dans le modèle de souris Townes SCD.

Enfin, l'hydroxyurée (HU) est un médicament utilisé dans la drépanocytose pour améliorer le profil clinique et la qualité de vie des patients SCD. L'HU réveille la synthèse d'hémoglobine fœtale (HbF) ce qui a plusieurs conséquences bénéfiques chez les patients SCD. Cependant, les effets spécifiques de ce traitement, combiné ou non à de l'entraînement en endurance sur les caractéristiques microvasculaires, structurales et énergétiques du muscle strié squelettique, restent encore inconnus.

Pour dresser le cadre théorique des études réalisées durant cette thèse, ce manuscrit comprend une revue de littérature composée de 5 chapitres. Le chapitre n°1 fait état d'une description détaillée de la pathologie, le chapitre n°2 détaille les bienfaits du traitement par HU utilisé comme traitement principale dans la drépanocytose. Le chapitre n°3 traite du muscle strié squelettique et des répercussions de la drépanocytose sur les caractéristiques du muscle strié squelettique, sur le remodelage microvasculaire, structural et énergétique des patients SCD. Le chapitre n°4 porte sur l'aptitude physique des patients SCD et de l'entraînement en endurance dans l'objectif de pouvoir l'utiliser comme stratégie thérapeutique. Enfin, le chapitre n°5 expose les différents modèles murins utilisés pour étudier la maladie.

Les 4 études réalisées au cours de ce projet de thèse sont détaillées à la suite de la revue de littérature ainsi que leurs matériels et méthodes. Les principaux résultats sont exposés et présentés sous forme d'article pour apporter une conclusion générale et conduire à des perspectives de travail. Un article sur l'étude n°2 a été soumis, un article sur l'étude n°1 s'apprête à être soumis. Ces résultats sont une pierre à l'édifice pour davantage faire progresser la recherche dans cette maladie complexe qu'est la drépanocytose.

REVUE DE LITTERATURE

Chapitre 1 : La drépanocytose

La Haute Autorité de Santé définit la drépanocytose comme « une maladie génétique de transmission autosomique récessive liée à une anomalie de la structure de l'hémoglobine qui aboutit à la formation d'hémoglobine S (HbS) ».

Pourtant mal connue du grand public, la drépanocytose (SCD) est la maladie génétique la plus répandue au monde avec 5 millions de personnes atteintes. Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) chaque année 300 000 bébés dans le monde naissent drépanocytaires, et la moitié de ces bébés n'atteignent pas les 5 ans. Alors quelle est cette maladie, et pourquoi touche-t-elle autant de personnes ? Quelles en sont les conséquences ? Quels en sont les symptômes et comment les traiter ?

I. Généralités

1) Historique

Au début du siècle dernier (1910), un médecin de Chicago, le Dr James Herrick diagnostique un premier cas d'anémie sévère, associée à une forme particulière du globule rouge (GR) évoquant celle d'une faucille. Il s'agissait d'un patient noir d'une vingtaine d'années, originaire de la Grenade (pays des Antilles) hospitalisé pour toux et fièvre. Ce premier cas scientifique décrivait un syndrome drépanocytaire : des palpitations, un essoufflement, un examen du sang relevant une anémie, et un nombre d'hématies n'atteignant que la moitié de la valeur normale. De nombreux autres cas avec des similitudes cliniques et biologiques se sont révélés (Herrick, 1910).

En 1922, le terme « Sickle Cell Disease (SCD) » est proposé pour l'appellation « drépanocytose » en français. Les premiers dépistages du trait drépanocytaire (SCT) sont réalisés en 1944 en Afrique de l'Ouest, en Afrique du Sud et au Nigeria, dans un contexte de médecine coloniale. L'objectif étant d'étudier ce qu'on appelle des « pathologies exotiques ». Dès 1949, les connaissances sur la maladie deviennent de plus en plus concrètes avec une intensification de la recherche, notamment grâce aux avancées scientifiques.

Jusqu'à la fin du XXème siècle, la SCD entraînait une mortalité infantile foudroyante. Aujourd'hui, les scientifiques et les médecins cherchent encore à avancer dans la compréhension de la maladie et dans de nouvelles façons de la traiter. Une journée internationale dédiée à la drépanocytose est apparue en 2008, il s'agit du 19 juin et cette même date a donné lieu à la signature de la reconnaissance de la maladie parmi les priorités de santé publique signée à l'ONU.

2) Génétique

Linus Pauling et Harvey Itano, chimistes et biochimistes Américains, montrent par des techniques séparatives que l'hémoglobine des GRs des patients SCD est différente de celle des hématies normales. Plus précisément, ils ont découvert une différence de migration électrophorétique de l'hémoglobine des hématies falciformes : l'hémoglobine S aurait une migration plus lente que l'hémoglobine A traduisant une différence de charge entre ces deux molécules (Pauling et al., 1949). La même année, le Docteur James V. Neel démontre que la transmission de la maladie suit une loi mendélienne, c'est-à-dire qu'elle répond aux principes de l'hérédité biologique : uniformité des hybrides de première génération, disjonction des allèles et indépendance de la transmission des caractères (Neel, 1949). En 1956, Vernon Ingram et John Hunt démontrent que la maladie est due à une mutation unique au niveau du deuxième nucléotide du 6ème codon (GAG6GTG) du gène codant pour la chaine β-globine. La mutation résulte en un polymorphisme nucléotidique pour laquelle une thymine est remplacée par une adénine conduisant, au niveau protéique, au remplacement de l'acide glutamique 6 de l'hémoglobine A par un résidu de la valine (Glu6Val) dans l'HbS. Cette mutation entraîne la formation de l'hémoglobine S (Ingram, 1959). La comparaison des structures des hémoglobines A et S a montré que les deux protéines ont des structures très similaires mais qu'elles diffèrent d'un acide aminé dans les peptides. En 1980, Robert Hebbel est le premier à observer l'adhérence vasculaire des cellules falciformes et c'est le début de la connaissance de la physiopathologie drépanocytaire.

La SCD est une maladie au mode de transmission autosomique récessif. En d'autres termes, pour que la maladie se déclare il faut que chacun des parents transmette un allèle muté à leur enfant.

Les deux gènes en cause dans la maladie ne sont pas situés sur les chromosomes sexuels mais sur l'une des 22 autres paires de chromosomes, appelés les « autosomes ». Chaque être humain porte deux copies de chaque gène (dont le gène b-globine impliqué dans la drépanocytose) et une copie est héritée de la mère, une copie est héritée du père. Ainsi, le terme « récessif » signifie que les deux copies du gène doivent être altérées pour que la maladie apparaisse. La descendance peut donc être (Figure 1) :

- Soit un sujet sain n'exprimant pas d'hémoglobine mutée donc affiche un génotype AA,
- Soit un sujet porteur du trait drépanocytaire, il possède alors un seul des 2 gènes muté et exprime environ 45% d'hémoglobine anormale, le sujet est dit AS et est asymptomatique (ou SCT pour Sickle Cell Trait en anglais),
- Soit un patient qui possède les 2 gènes mutés et exprime environ 95% de l'hémoglobine anormale (HbS), il est dit SS et est particulièrement malade (ou SCD pour Sickle Cell Disease en anglais).

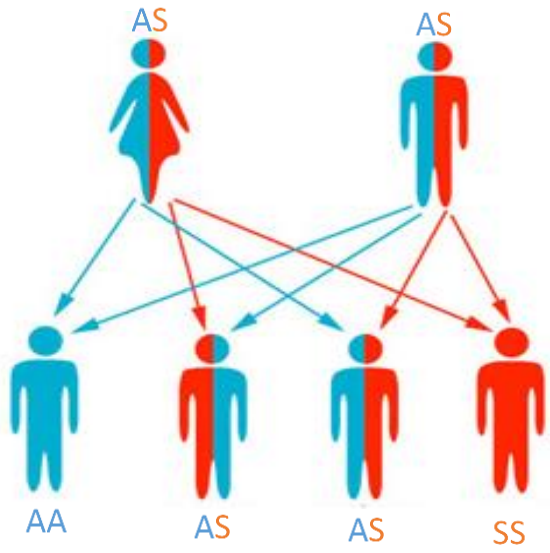


Figure 1 : Mode de transmission autosomique récessif de la drépanocytose.

La notion d'asymptomatique est sujette à débat car il a déjà été relevé des fortes complications chez des patients AS (ou SCT). En effet, bien que les sujets dits AS ne soient pas anémiques, plusieurs études ont rapporté des cas d'infarctus splénique, de rhabdomyolyse, d'insuffisance rénale aiguë, de cardiomyopathie ou de mort subite, notamment suite à une activité physique intense (Connes et al., 2006; Dincer, 2005; Wirthwein et al., 2001). Ce point est développé dans le chapitre n°3 de ce manuscrit.

En accord avec une autre étude (Kleiger et al., 2005), Connes et collaborateurs ont d'ailleurs suggéré par leurs données que les sujets asymptomatiques pourraient être plus prédisposés aux complications vasculaires que les sujets ayant une hémoglobine normale.

3) Epidémiologie

Dans une étude de Piel et collaborateurs, il est suggéré que, chaque année, environ 300 000 nourrissons naissent avec une anémie falciforme (Figure 2) et ce nombre pourrait atteindre les 400 000 en 2050. La grande majorité de ces naissances ont lieu au Nigéria, en République démocratique du Congo et en Inde (Piel et al., 2014). Le nombre de patients SCD devrait augmenter tant dans les pays à revenu élevé que dans les pays à faible revenu. En effet, dans les pays à revenu élevé, cette augmentation reflète en grande partie les gains d'espérance de vie des personnes touchées grâce à des interventions comme le dépistage néonatal (NBS), la prophylaxie à la pénicilline, la prévention primaire des accidents vasculaires cérébraux (AVC) et le traitement à l'hydroxyurée (HU) que nous aborderons plus tard dans le chapitre n°2. En revanche, dans les pays à faible revenu, la mortalité infantile toutes causes confondues a été considérablement réduite au cours des deux dernières décennies grâce à la vaccination, l'amélioration générale des conditions de vie et le développement des services de santé. Ainsi un nombre accru de bébés et de jeunes enfants atteignent désormais l'âge adulte, mais leur survie dépend d'un diagnostic précoce. En revanche, l'espérance de vie des patients SCD est réduite d'environ 30 ans car leur qualité de vie est souvent médiocre même avec les meilleurs soins médicaux possibles.

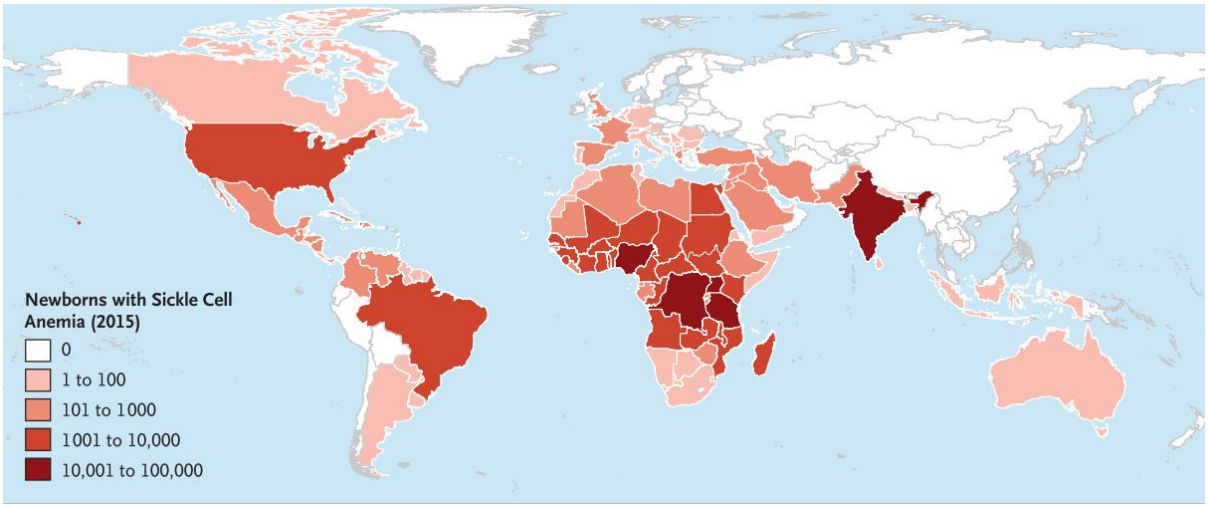


Figure 2 : Nombre de nouveau-nés atteints d'anémie falciforme en 2015 (Piel et al., 2017).

C’est dans les régions d’Afrique subsaharienne, du bassin méditerranéen, du Moyen-Orient et de l’Inde que la prévalence de la maladie est la plus élevée (Piel et al., 2010). Avec les mouvements de population, l’esclavage puis les migrations contemporaines, la drépanocytose est apparue en Europe, aux Antilles et aux Etats-Unis (Figure 3) (Piel et al., 2014). Les estimations démographiques aux États-Unis suggèrent qu'au total, environ 100 000 personnes sont atteintes de la maladie. En Afrique Subsaharienne, la prévalence peut atteindre 1 naissance sur 30 et un afro-américain sur 365 nait avec la maladie, 1 sur 14 porte le trait drépanocytaire (Hassell, 2010; Platt, Brambilla, et al., 1994). En France en 2013, plus de 400 enfants ont été diagnostiqués atteints de la maladie ce qui fait de cette maladie génétique la plus fréquente. Le dépistage néonatal et la vaccination systématique des enfants font défaut et le paludisme, la malnutrition et la pauvreté demeurent des défis importants. La mortalité des enfants drépanocytaires de moins de 5 ans peut atteindre 90% en Afrique Subsaharienne. Aujourd’hui la SCD est considérée comme la maladie rare la plus répandue dans le monde, avec 5 millions de personnes atteintes (Piel et al., 2017).

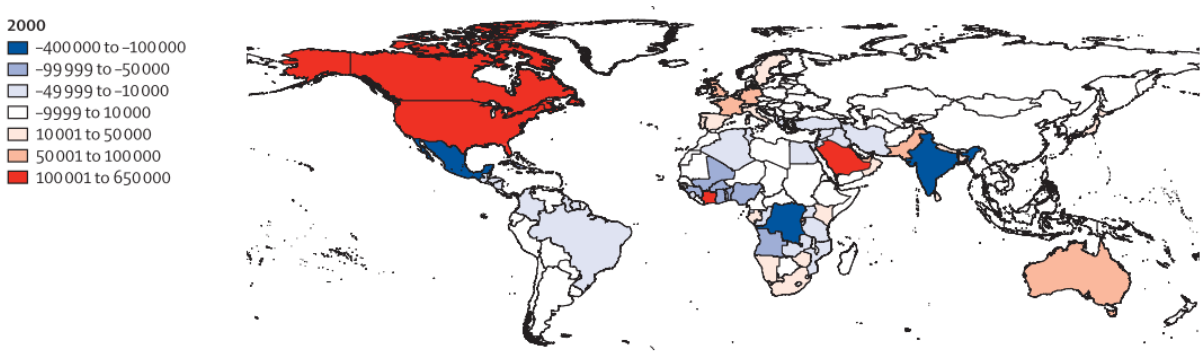


Figure 3 : Estimation des migrations nettes d'individus avec HbS au niveau du pays en 2000.

Les pays en rouge correspondent à ceux dans lesquels le nombre estimé d'immigrants avec HbS est supérieur au nombre estimé d'émigrants avec HbS. Les pays en bleu correspondent à ceux dans lesquels le nombre estimé d'immigrants avec HbS est inférieur au nombre estimé d'émigrants avec HbS (Piel et al., 2014).

4) Mutation et paludisme

Il y a plus de 50 ans, il a été suggéré que le gène responsable de ce trouble drépanocytaire pouvait atteindre des fréquences élevées dans les zones où sévit le paludisme en raison de la résistance au plasmodium falciparum par l'état porteur hétérozygote. Il y a une relation complexe entre le paludisme et la drépanocytose, un exemple de polymorphisme équilibré.

La mutation drépanocytaire a été associée à 5 haplotypes (groupe d'allèles de différents loci situés sur un même chromosome et habituellement transmis ensemble) désignés d'après leur épicentre, dont 4 haplotypes africains : Bantou, Cameroun, Sénégal et Bénin, et un haplotype arabo-indien. Ce sont des zones où sévit le paludisme, une maladie infectieuse due à un parasite, le plasmodium falciparum, propagée par la piqûre de certaines espèces de moustiques.

Des chercheurs ont émis l'hypothèse selon laquelle la protection contre le paludisme par l'HbS implique le renforcement non seulement de l'immunité innée mais également acquise contre le paludisme. Quand un hème est libre dans le sang, il y a une synthèse de l'enzyme hème-oxygénase-1 qui va dégrader les hèmes libres en monoxyde de carbone. Ce dernier va alors se fixer sur l'hémoglobine pour bloquer la libération d'hèmes. La dangerosité du paludisme tient au fait de la libération excessive d'hèmes dans le sang. Or, il s'avère que les patients hétérozygotes produisent en grande quantité l'hème-oxygénase-1. Quand l'infection va commencer, les hèmes vont se libérer dans le sang, l'organisme va sécréter énormément d'hème-oxygénase-1 ce qui va bloquer les effets du paludisme (Allison, 1954). Ainsi, l'héritage d'un seul gène (hétérozygote) confère une protection contre le paludisme alors que l'héritage de 2 gènes (homozygote) conduit à la SCD et n'apporte pas une telle protection. Finalement, les zones pour lesquelles sévit la drépanocytose se superposent à celles où sévit le paludisme (Figure 4) (Piel et al., 2010).

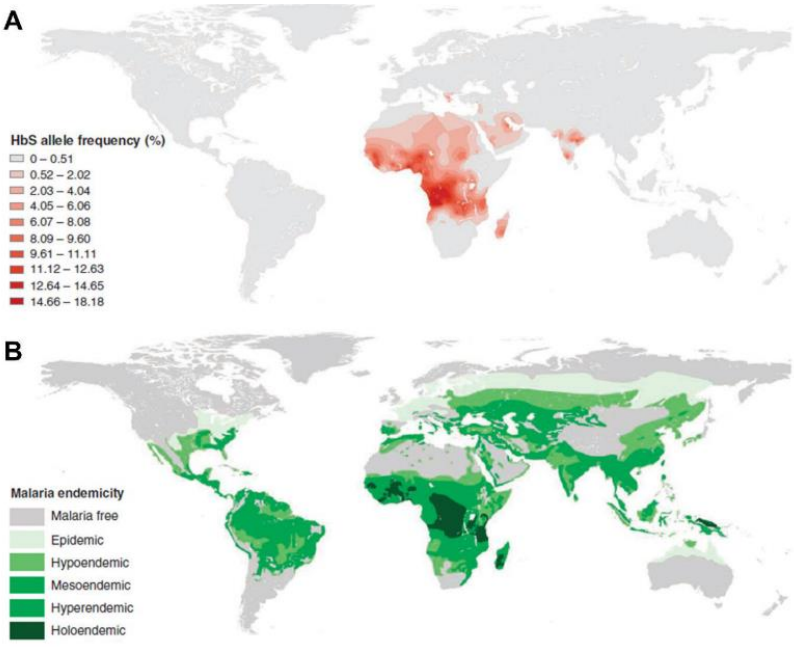


Figure 4 : Carte de la distribution globale de la drépanocytose et l'endémicité du paludisme (Piel et al., 2010).

5) Diagnostic

Le diagnostic de la SCD est posé en examinant la forme des GRs et de l'hémoglobine, et en réalisant des tests génétiques. Le programme de dépistage (NBS) fait référence à plusieurs techniques qui comprennent dans un premier temps, l'analyse au microscope d'un frottis sanguin (qui permet de mettre en évidence la présence, ou non, de GRs falciformes). L'analyse de l'hémoglobine par électrophorèse et chromatographie liquide à haute performance (HPLC) permet de mettre en évidence la présence de l'HbS. Chacune de ces techniques a ses propres avantages et limites (Naik & Haywood, 2015). La SCD ne peut difficilement être confondue car les manifestations de la maladie sont vraiment caractéristiques. Dans un second temps, les tests génétiques, permettent d'identifier précisément la mutation du gène de la β-globine impliquée dans la maladie mais aussi certains facteurs de risque de complications.

La grossesse a longtemps été associée une mortalité maternelle et fœtale élevée mais grâce aux techniques, au NBS, et aux mesures de prévention (vaccination et antibioprophylaxie) les résultats globaux de la maladie et la survie des patientes se sont améliorés, et les taux de mortalité maternelle et néonatale ont également diminué (Sosa & Udden, 2018). L'étude de Piel et collaborateurs (Piel, Hay, et al., 2013) a relaté que la mise en œuvre d'un dépistage universel et d'autres mesures spécifiques devraient réduire la surmortalité dans les pays à revenu faible et les pays à revenu relevé ce qui pourrait sauver près de dix millions de vies d'ici 2050. Ce programme de dépistage prénatal universel (NBS) s'est développé aux Etats-Unis, au Royaume-Uni et dans les DOM-TOM. En effet, suite à la migration des populations la maladie gagne du terrain dans le monde entier et les mesures de préventions se développent même dans les pays à revenus faibles même si en Afrique, les programmes de dépistage à grande échelle sont encore rares (Piel et al., 2014; Piel, Hay, et al., 2013).

II. Caractéristiques pathologiques de la drépanocytose

1) L'hémoglobine et ses sous-unités

Le globule rouge est une cellule biconcave et très souple (environ 8 µm de diamètre). Cette dernière caractéristique lui confère une grande déformabilité, ce qui lui permet de circuler dans les capillaires d'un diamètre pourtant inférieur (5 µm de diamètre en moyenne).

Dans le cytoplasme de ce GR se trouve une métalloprotéine appelé plus communément l'hémoglobine, qui assure le transport de l'oxygène dans le sang pour le distribuer à tous les organes. Un GR humain contient 280 millions de molécules d'hémoglobine. L'hémoglobine humaine est une molécule dite tétramétrique, elle possède 4 chaînes polypeptidiques de globines identiques deux à deux, associées à 4 molécules d'hèmes. L'oxygène va venir se fixer grâce à l'hème, une protéine solidement fixée à chacune des chaînes de globine. Une hémoglobine peut donc lier jusqu'à 4 molécules d'oxygène (Figure 5).

Il existe trois types de sous-unités d'hémoglobine présentent en plus ou moins grande quantité :

- L'hémoglobine humaine A est présente en grande quantité (95 à 98%) : c'est une molécule constituée de chaînes de globines assemblées entre elles, deux chaînes dites alpha α, et deux chaînes dites beta β ;
- L'hémoglobine A2 est présente en faible quantité (2 à 3%) : c'est une molécule variante normale avec deux chaînes alpha α et deux chaînes delta δ notées α2δ2 ;
- L'hémoglobine fœtale (HbF) est présente en chaînes gamma γ notées α2γ2. La particularité de l'hémoglobine F est qu'à la naissance, elle représente le constituant hémoglobinique principal avec un taux de 90%. Totalement fonctionnelle pour le transport de l'oxygène, son affinité pour l'oxygène comparativement à l'hémoglobine adulte est supérieure. Ce type d'hémoglobine est synthétisé chez les fœtus et disparaît à terme, sauf dans le cas de certaines maladies comme la SCD. Nous détaillerons ce point dans le chapitre 3, les conséquences de la drépanocytose sur le muscle.

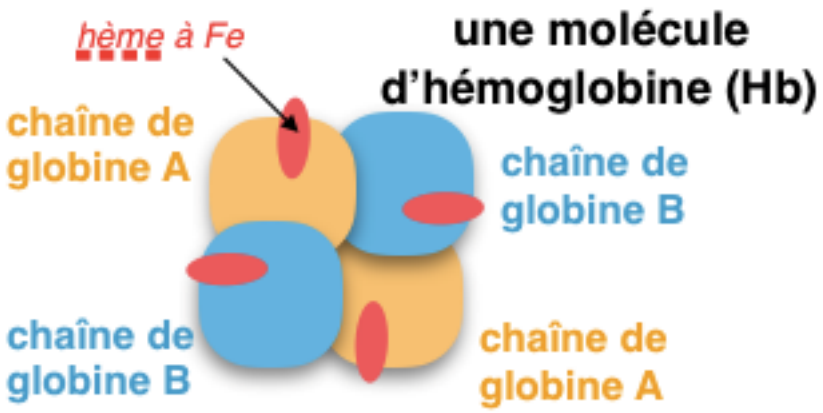


Figure 5 : Constitution d'une molécule d'hémoglobine (Hb).

2) *L'hémoglobine dans la drépanocytose*

Dans le cas de la drépanocytose, cette hémoglobine falciforme HbS va posséder deux sous-unités alpha α et 2 sous-unités beta S βS notées α2βS2. Un patient de génotype dit SS va posséder 80 à 90% de cette hémoglobine S, et un patient de génotype dit AS en possédera en plus faible quantité soit 30 à 40%. A l'inverse, un patient drépanocytaire SS aura un taux d'hémoglobine fœtale (HbF) plus important soit 5 à 15% (Ware et al., 2017). D'autres génotypes de la drépanocytose sont dus à l'hétérozygotie composée du gène HbS et d'autres variantes de l'hémoglobine (Hb) telles que HbC, HbE et HbD ou aux nombreuses variétés de HbS–β-thalassémie. Les génotypes hétérozygotes composés de la drépanocytose sont généralement moins graves sur le plan clinique que le génotype homozygote HbSS de l'anémie falciforme, la drépanocytose.

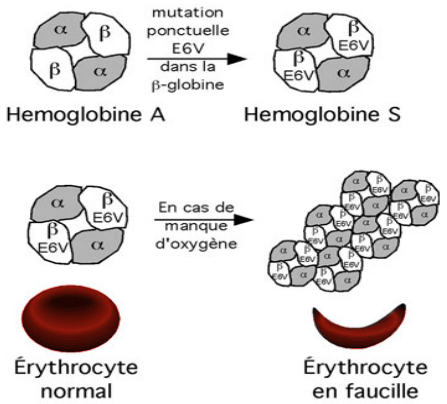


Figure 6 : Composition d'un érythrocyte normal et d'un érythrocyte en faucille.

3) *Polymérisation de l'hémoglobine S*

Dans sa forme désoxygénée, l'HbS change de conformation provoquant la polymérisation de la molécule. Plus précisément, l'HbS change de charge et de polarité dû à la substitution de l'acide glutamique par une valine. L'acide glutamique est un acide aminé chargé négativement et hydrophile. La valine est un acide aminé non chargé et hydrophobe qui établit des liaisons hydrophobes avec d'autres résidus hydrophobes sur la chaine β d'une autre désoxyhémoglobine S adjacente (Vekilov, 2007). L'interaction β−β entraîne la formation d'un polymère, allongé en 14 fibres hélicoïdales qui se regroupent et se rigidifient entrainant la falciformation du globule rouge en forme de faucille (Bunn, 1997).

Ce GR présente alors une rigidité accrue et une déformabilité moindre, engendrant des dommages dans le cytosquelette et la membrane érythrocytaire. Cependant, ce processus est réversible et sous l'effet d'une réoxygénation, le GR peut reprendre sa forme initiale. L'élévation de la température (Hofrichter et al., 1974), l'acidose, la déshydratation cellulaire, une augmentation du taux de 2,3-DiPhosphoGlycérate (Eaton and Bunn 2017) et l'hypoxie (Rees et al., 2010) sont des facteurs susceptibles de favoriser la polymérisation de l'hémoglobine S et développés plus loin dans ce chapitre n°1. En revanche, la présence d'HbA ou d'HbF restreint ce processus de polymérisation (Adachi & Asakura, 1984; Steinberg & Embury, 1986). Ce processus de polymérisation de l'HbS va également influencer son affinité pour l'oxygène (Eaton & Hofrichter, 1987). En effet, en condition normale, l'hémoglobine se lie avec l'oxygène et son affinité est dépendante de sa saturation. Selon un procédé allostérique, la courbe d'affinité de l'oxygène pour l'hémoglobine prend alors une allure sigmoïdale.

La P50 est la pression partielle en oxygène pour laquelle l'hémoglobine est saturée à 50 % d'oxygène. Plus la valeur de P50 est faible, plus l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène est élevée. Dans la drépanocytose, il est observé une augmentation de la P50 ce qui signifie que, pour une pression donnée, le sang des patients drépanocytaires est moins saturé en oxygène, traduisant une diminution du pouvoir oxyphorique (Elbaum & Nagel, 1981; Lonsdorfer et al., 1990). Une faible pression en oxygène et une forte P50 au niveau tissulaire, engendre une faible affinité et donc une libération facilitée de l'oxygène au niveau des tissus périphériques (Elbaum & Nagel, 1981) et de ce fait, une augmentation de la proportion d''HbS désoxygénée, potentiellement polymérisable.

Les patients drépanocytaires présentent un taux résiduel d'hémoglobine F allant de 5 à 15% et cette dernière compense en partie les anomalies liées au faible pouvoir oxyphorique.

4) Conséquences physiopathologiques de la faucille

Les GRs falciformes présentent des anomalies dans les caractéristiques rhéologiques et dans l'expression des molécules d'adhérence, entraînant une anémie hémolytique et une probabilité de blocage des petits vaisseaux sanguins, qui à leur tour provoquent une vaso-occlusion.

La crise vaso-occlusive (CVO) entraîne généralement des complications aiguës comme des lésions ischémiques des tissus, et une douleur intense ou une défaillance d'organe (Vichinsky et al., 2000). Ces premiers événements entraînent une cascade d'autres complications : des dysfonctions vasculaires et/ou endothéliales, une carence fonctionnelle en oxyde nitrique (NO) (diminution de la biodisponibilité du NO), de l'inflammation, du stress oxydatif, des lésions de reperfusion, de l'hypercoagulabilité, une augmentation de l'adhérence des neutrophiles et l'activation des plaquettes (Piel et al., 2017). Certaines études (Koshy et al., 1990; Le Jeune et al., 2019) ont émis l'hypothèse que la dysfonction vasculaire et endothéliale étaient-elles même responsables ces crises vaso-occlusives.

Les complications chroniques se répartissent en deux groupes principaux (Gladwin et al., 2004; Kato et al., 2009) :

- Celles liées à la vasculopathie des gros vaisseaux : maladie cérébro-vasculaire, hypertension pulmonaire, priapisme et rétinopathie ;
- Et celles causées par des lésions ischémiques progressives des organes : hyposplénisme (cause importante de maladie et de décès chez les jeunes enfants), insuffisance rénale, maladie osseuse et dommage du foie.

a) Les crises vaso-occlusives (CVOs)

Définies comme l'obstruction locale de la circulation sanguine par agrégation de GRs dans les capillaires (Rees et al., 2010), les CVOs sont les manifestations cliniques les plus fréquentes chez les patients drépanocytaires, et surtout les plus sévères. Les CVOs constituent la première cause d'hospitalisation des patients drépanocytaires. Elles se manifestent par des douleurs très intenses, affectant particulièrement les articulations des bras et des jambes, le dos ou la poitrine. Chez les enfants, la crise se manifeste généralement par un gonflement douloureux des mains et des pieds, appelé le syndrome « pied-main ». N'importe quel territoire vasculaire peut être impacté mais ce sont les extrémités des hanches et l'abdomen les plus concernés (Ahmed et al., 2005; Ejindu et al., 2007).

L'origine de ces occlusions est complexe et multifactorielle, souvent inflammatoire. En effet, les épisodes d'hypoxie ou inflammatoires augmentent le potentiel d'adhérence endothéliale des leucocytes et des GRs, facteur déclencheur de la crise (Belcher et al., 2003; Frenette, 2002; Osarogiagbon et al., 2000) (Figure 7).

Les CVOs peuvent elles-mêmes conduire à d'autres complications comme des accidents ischémiques, des défaillances d'organes comme la rate et les reins, ou des accidents vasculaires cérébraux (AVC). Ainsi, l'hyposplénisme (diminution des fonctions de la rate), l'insuffisance rénale ou encore les atteintes hépatiques ne sont pas rares dans la SCD. Elles peuvent aussi causer l'apparition du syndrome thoracique aigu (STA) développé ci-dessus. Finalement, ces différents éléments constituent un cercle vicieux pour le patient drépanocytaire.

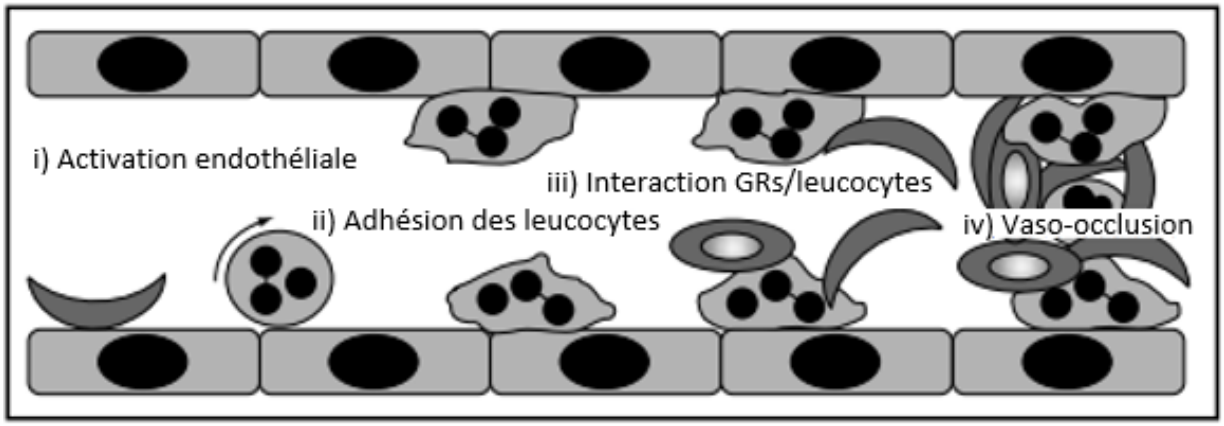


Figure 7 : Représentation des différentes étapes intervenant dans la genèse des CVO. D'après (Frenette, 2002).

b) Le syndrome thoracique aigu (STA)

Le syndrome thoracique aigu (STA ou ACS pour « acute chest syndrome » en anglais) est caractérisé par de fortes douleurs dans l'abdomen. C'est la première cause de mortalité chez les patients drépanocytaires et la seconde cause d'hospitalisation (Osarogiagbon et al., 2000). Quatre causes principales ont été décelées impliquant la pneumonie, une infection systémique, une embolie graisseuse et une CVO au niveau pulmonaire. En effet, le STA résulte d'une occlusion des capillaires pulmonaires suivie de phénomènes physiopathologiques complexes.

Outre la douleur, des symptômes cliniques apparaissent et ceux-ci dépendraient de l'âge : état fébrile, symptômes respiratoires comme une respiration sifflante, tachypnée (accélération anormale de la fréquence respiratoire), toux et hypoxémie (Vichinsky et al., 2000). Ce phénomène de STA est une complication grave de la maladie, les poumons n'exercent plus efficacement leur fonction qui est de fournir de l'oxygène au sang et in fine, à tous les organes.

c) Les anémies hémolytiques sévères

L'anémie est le premier signe caractéristique de la maladie, elle se traduit par une pâleur et une fatigue chronique, et est susceptible de s'aggraver brutalement en cas de suractivité de la rate dans la destruction des GRs. L'anémie hémolytique chronique est sévère, elle se caractérise par un faible taux d'hémoglobine (7 et 9 g/dL ; valeurs normales : 12-16 g/dL), un taux élevé de réticulocytes (2 à 3% ; valeur normale : 0,45 à 1,8%) et un taux d'hématocrite très faible (25-30% ; valeur normale : 37-52%) (Rees et al., 2010).

Malgré ces complications possibles, l'anémie chronique est généralement assez bien tolérée par les drépanocytaires mais la polymérisation de l'hémoglobine S induit des dommages au niveau des GRs, ceux-ci deviennent plus fragiles, se rompent plus facilement : c'est l'hémolyse. Ainsi, ils libèrent dans le plasma l'hémoglobine qu'ils contiennent. L'hémolyse est un phénomène physiologique normal du globule rouge vieillissant qui peut être intra- ou extravasculaire, intervenant au bout de 120 jours en moyenne, 1 % des GRs d'un individu sont remplacés quotidiennement, or, pour un GR contenant de l'HbS, la durée de vie est seulement de 15 jours en moyenne (McCurdy & Sherman, 1978). L'hémolyse favorise le développement de vasculopathies qui se compliquent d'une hypertension systémique et pulmonaire chez les patients drépanocytaires (Cancado et al., 2008).

Suite à l'hémolyse, l'hémoglobine circulante peut aussi libérer ses molécules d'hème (Ponka, 1999), hautement inflammatoire et qui contient du fer pouvant activer un récepteur de reconnaissance de l'immunité innée, le TLR4 pour « toll-like receptor 4 ». L'activation de TLR4 par l'hème peut engendrer des STA, la production de molécules inflammatoires et des phénomènes de vaso-occlusion (Belcher et al., 2014; Ghosh et al., 2013). De plus, la dysfonction endothéliale avec diminution de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO) et augmentation de l'expression des molécules d'adhérence est une conséquence connue de l'hémolyse et de l'inflammation systémique (Belcher et al., 2014).

III. Facteurs de risques associés à la drépanocytose

1) Hypoxie, hyperthermie et déshydratation

Le processus de polymérisation de l'HbS est un phénomène directement impliqué dans la physiopathologie de la drépanocytose. La molécule d'HbS a tendance à polymériser uniquement dans sa forme désoxygénée et par conséquent, toute situation hypoxémique et hypoxique va constituer un facteur de risque chez les patients drépanocytaires, potentiellement favoriser la falciformation des GRs et l'occurrence des CVO (Rees et al., 2010). Il a été montré en accord avec cet élément que le risque d'évènements pathologiques liés à la présence d'HbS est accru en altitude que ce soit au cours de voyages en avion ou d'expéditions en montagne (Claster et al., 1981). De plus, il a été montré in vitro que le délai de polymérisation était fortement dépendant de la température et qu'une augmentation de la température corporelle de 37 à 38.5°C pouvait avoir pour conséquence de doubler la propension de l'HbS à polymériser, et donc de doubler la propension des GRs à falciformer (Hofrichter et al., 1974).

Enfin, les hématies falciformes présentent une forte altération des mécanismes responsables de la régulation du contenu intra-érythrocytaire en eau. Le faible contenu en eau des GRs falciformes limiterait leur capacité à retrouver leur structure normale en cas de réoxygénation et ce phénomène s'expliquerait par le fait que la quantité d'eau serait insuffisante pour solubiliser le polymère d'HbS (Clark et al., 1980). La déshydratation des patients drépanocytaires favoriserait l'apparition des GRs falciformes irréversibles, et serait aussi fortement impliquée dans l'occurrence des CVO (Rees et al., 2010).

2) Acidose

Un autre facteur influençant la falciformation des GRs est l'acidose, un des premiers paramètres à avoir été décrit. Plusieurs études in vitro ont confirmé que la diminution du pH est concomitante avec une augmentation de la polymérisation de l'HbS (Bookchin et al., 1976; Magdoff-Fairchild et al., 1976; Ueda & Bookchin, 1984) et par conséquent, que ce phénomène est susceptible de résulter de l'effet Bohr. En effet, le pH peut moduler le profil de dissociation de l'oxyhémoglobine et déplacer la courbe correspondante vers la droite (Schmidt-Nielsen, 1997) (Figure 8). En d'autres termes, pour une pression d'oxygène donnée, l'acidose se traduit par une diminution de la saturation en oxygène. Si, dans un contexte physiologique, cela peut apparaître bénéfique dans certains tissus en favorisant la distribution d'oxygène, cela peut

constituer un facteur de risque dans des conditions pathologiques, notamment dans la drépanocytose. En effet, en favorisant la distribution d'oxygène par les GRs, l'acidose augmenterait le temps pendant lequel l'hémoglobine est dans un état désoxygéné (Hofrichter et al., 1974). Si l'effet Bohr représente un phénomène favorisant la polymérisation de l'HbS, d'autres facteurs contributifs ont été décrit. Il a été montré que la diminution du pH est directement associée à la stimulation de la polymérisation de l'HbS indépendamment de l'effet Bohr classique (Briehl & Ewert, 1973). Conformément à cette première observation, Ueda et collaborateurs (1979) ont démontré que l'effet Bohr était plus prononcé chez les patients drépanocytaires que chez les sujets sains, suggérant que l'HbS est plus affectée par l'acidose et donc des mécanismes autres que l'effet Bohr seraient impliqués dans ces processus (Ueda et al., 1979). Une petite diminution du pH favoriserait une plus grande désoxygénation de l'HbS par rapport à l'Hb normale.

Les GRs ont une teneur réduite en eau intracellulaire (Clark et al., 1980). La réduction de la teneur en eau intracellulaire serait directement associée à une augmentation de la concentration en HbS, un facteur bien décrit affectant le temps de retard et donc la polymérisation de l'HbS (Hofrichter et al., 1974). De plus, étant donné que la présence d'eau au niveau intra-érythrocytaire solubiliserait le polymère d'HbS, une régulation altérée de sa quantité pourrait jouer un rôle important dans la physiopathologie de la drépanocytose en diminuant la capacité des GRs à retrouver leur structure normale en réponse à réoxygénation (Clark et al., 1980).

Comme la polymérisation de l'HbS est la cause principale de la falciformation des GRs et que l'acidose pourrait favoriser la polymérisation de l'HbS, l'acidose pourrait aussi être considérée comme un facteur expliquant la falciformation des GRs. Plusieurs études in vitro ont rapporté une augmentation du processus de falciformation associée à une diminution du pH (Greenberg et al., 1957; Greenberg & Kass, 1958). Une étude de cas soutient fortement que l'acidose métabolique in vivo peut déclencher une CVO (Greenberg & Kass, 1958). Il a été démontré que les patients drépanocytaires présentant une viscosité sanguine élevée à l'état d'équilibre avaient des hospitalisations plus fréquentes pour CVO (Lamarre et al., 2012; Nebor et al., 2011). Il apparaît qu'une diminution du pH augmenterait la viscosité du sang (Reinhart, Gaudenz, & Walter, 2002) et, in fine, le risque de CVO, indépendamment des effets directs de l'acidose sur la polymérisation de l'HbS et la falciformation des GRs.

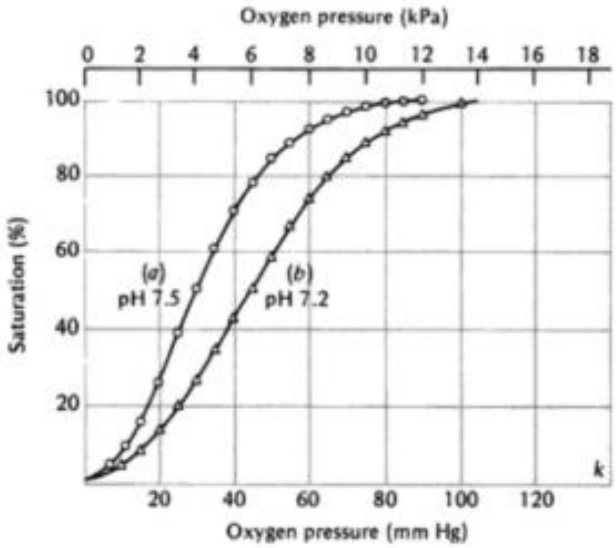


Figure 8 : Effet Bohr, effet du pH sur la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine (Schmidt-Nielsen 1997)

3) Syndrome métabolique (SM)

Les patients drépanocytaires peuvent souffrir d'inflexibilité métabolique, associée à diverses autres maladies comme le syndrome métabolique (SM). Le syndrome métabolique est un facteur de risque clé pour l'incidence des maladies cardiovasculaires (MCV) et la mortalité toutes causes confondues, mais sa prévalence chez les patients atteints de drépanocytose n'est pas bien connue car très peu d'études l'ont examiné. Le syndrome métabolique est un groupe d'affections telles que l'obésité viscérale, l'hypertriglycéridémie et l'hyperglycémie qui sont associées à une multiplication par deux des résultats des maladies cardiovasculaires et à une multiplication par 1,5 de la mortalité. En effet, les personnes atteintes de SM ont une augmentation de 46 % de la mortalité toutes causes confondues par rapport aux personnes sans SM (Hui et al., 2010).

Pour diagnostiquer le syndrome métabolique, les patients doivent répondre à trois facteurs sur cinq : une augmentation du tour de taille, des taux de triglycérides, de la pression artérielle et de la glycémie à jeun, et une diminution des taux de HDL (lipoprotéines de haute densité, « bon cholestérol ») (Grundy et al., 2005; Ogunsile et al., 2019).

Chez les patients SCD, plusieurs études ont mesuré tous ces paramètres supplémentaires pour déterminer de nouvelles informations sur le développement du SM (Babiker & Kaddam, 2018). Ogunsile et collaborateurs ont rapporté que 14,3 % de leur cohorte remplissait les

critères du SM (Ogunsile et al., 2019). En comparaison, la prévalence du SM ajustée selon l'âge chez les Afro-Américains aux États-Unis est de 27 % (Hui et al., 2010; Ogunsile et al., 2019). Dans une autre étude il s'est avéré que le tour de taille des patients SCD ne présentait pas de différences suffisamment significatives par rapport au groupe témoin pour être considéré comme l'un des facteurs du SM (Alsultan et al., 2010). Cependant, il a été rapporté que les patients SCD peuvent développer une résistance à l'insuline, peut-être en raison de l'hémoglobine falciforme HbS associée à une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à une diminution des antioxydants, ou à une augmentation des taux de ferritine, entraînant des effets importants sur la glycémie et le profil lipidique (Alsultan et al., 2010).

4) Obésité viscérale

Les taux d'obésité dans la drépanocytose augmentent, et sont peut-être exacerbés par le fait que la durée de vie des patients atteints de drépanocytose a considérablement augmenté au cours des trois dernières décennies (Lanzkron, Carroll, and Haywood 2013). Dans le même temps, une étude (Jang et al., 2021) a observé que la prévalence de l'obésité chez les patients drépanocytaires était faible. Cette observation pourrait être expliquée par l'hypermétabolisme (Hibbert et al., 2005) associé au processus inflammatoire en cours qui se produit chez les patients drépanocytaires, augmentant le renouvellement des GRs (Patel et al., 2015) et par conséquent, assurant une consommation d'énergie accrue qui empêche le développement de l'obésité.

IV. Les différences entre les hommes et les femmes drépanocytaires

Il semblerait que les symptômes de la SCD soient similaires entre les hommes et les femmes en revanche, si on s'intéresse aux aspects hématologiques, physiologiques et musculaires, quelques différences sont notables pouvant expliquer pourquoi les femmes drépanocytaires vivent plus longtemps que leurs homologues masculins (Ballas et al., 2016).

Une étude de Masese et collaborateurs a mis en évidence que les hommes présentaient significativement plus de complications associées à une mortalité accrue, notamment ulcères cutanés, syndrome thoracique aigu, complications musculosquelettiques, génito-urinaires et cardiovasculaires (Masese et al., 2021). En revanche, dans cette même étude et en accord avec

la littérature (Platt, Brambilla, et al., 1994) les femmes avaient une plus grande consommation d'opioïdes, des scores de fréquence et de gravité de la douleur significativement plus mauvais, et des fréquences d'hospitalisations plus importantes que les hommes drépanocytaires. Les femmes avaient aussi des taux plus élevés d'anxiété, de dépression et de maladies auto-immunes (Masese et al., 2021).

1) Hémoglobine fœtale et répercussions cliniques

L'HbF diminue la proportion d'HbS et donc, réduit le risque de polymérisation, diminue ainsi le nombre et la fréquence des CVO. Les femmes drépanocytaires ont des niveaux plus élevés d'hémoglobine fœtale (HbF) (Dover et al., 1992; Steinberg et al., 1995) ce qui pourrait être bénéfique, améliorant potentiellement leur espérance de vie. Dans leur étude, Steinberg et collaborateurs ont attribués ce taux d'HbF plus élevés à l'haplotype P-globine. L'HbF élevée dépendante de l'haplotype des femmes peut résulter d'un contrôle lié au chromosome X (ou hormonal) de la production d'HbF, interagissant avec des régions d'ADN régulatrices spécifiques de l'haplotype. Par exemple, les femmes SCT de l'haplotype Sénégal/Sénégal et Sénégal/Bénin présentaient les taux moyens d'HbF les plus élevés (10,9 % ou 1,0 g/dl). Une autre explication au taux d'HbF plus élevée chez les femmes résiderait du fait que le volume globulaire moyen (VGM) chez les femmes est supérieur à celui des hommes et cette augmentation du VGM est une cause de l'anémie.

Dans le même temps, les femmes drépanocytaires auraient une anémie plus sévère que les hommes drépanocytaires (Delclaux et al., 2005; Steinberg et al., 2003) entraînant une baisse de la viscosité du sang et donc, réduisant également le nombre de CVOs, et limitant les répercussions, notamment au niveau microvasculaire (Platt et al., 1991; Platt, Brambilla, et al., 1994; Ravelojaona et al., 2015). L'anémie plus sévère chez les femmes pourrait être attribué aux cycles menstruels. En revanche, il a également été démontré qu'une anémie sévère peut augmenter le risque de décès.

2) *Biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO)*

Une autre différence notable entre les hommes et les femmes SCD est l'oxyde nitrique (NO). Gladwin et son équipe ont montré que la biodisponibilité du NO ne semble pas altérée chez la femme, entraînant ainsi une meilleure réactivité et une meilleure saturation périphérique en oxygène (Figure 9). Il convient également de noter que le NO est également lié au contrôle de la transcription de l'HbF (Habara et al., 2017) ce qui signifie qu'une différence de sa biodisponibilité peut également induire une expression variable de l'HbF entre les hommes et les femmes drépanocytaires.

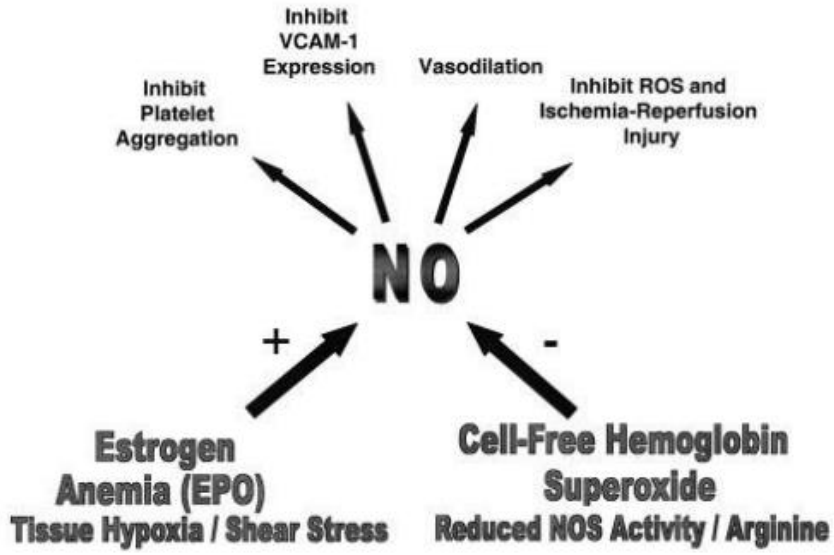


Figure 9 : Rôle majeur du NO dans la drépanocytose (Gladwin et al., 2003).

3) *Hormones sexuelles et changements hormonaux*

Les différences musculaires entre hommes et femmes homozygotes à la maladie pourraient s'expliquer en partie par l'influence des hormones sexuelles, les œstrogènes (Gladwin et al., 2002). On sait également que les œstrogènes induisent une augmentation de l'expression du NO et donc, limitent la dysfonction endothéliale. L'effet protecteur des œstrogènes sur l'ischémie-reperfusion rend également les femmes drépanocytaires plus résistantes que les hommes drépanocytaires aux épisodes ischémiques (Gladwin & Vichinsky, 2009; Reiter et al., 2002).

La fertilité des femmes est un sujet assez flou car peu d'études ont abordé ce sujet de manière prospective. Actuellement, il n'y a pas de consensus sur la question de savoir si les

femmes SCD courent un risque accru d'infertilité (Dunne & Joseph, 1970), en revanche un point important concernant l'apparition retardée des règles est à souligner (Zemel et al., 2007) ainsi que l'apparition précoce de la ménopause (Ngo et al., 2014). La sexualité chez les hommes drépanocytaires a été étudiée plus fréquemment et un retard de maturation sexuelle est observé (1,5 à 2 ans en moyenne). Jusqu'à 24 % des hommes SCD peuvent développer un hypogonadisme, un syndrome clinique associé à une faible production de testostérone, à l'infertilité, à la dysfonction érectile et à une mauvaise libido (Taddesse et al., 2012; Zemel et al., 2007). Certains des problèmes de reproduction liés à la drépanocytose surviennent en raison de thérapies médicales chroniques qui sont de plus en plus utilisées pour prévenir ou gérer la morbidité liée à la drépanocytose (Smith-Whitley, 2014).

V. Prise en charge et traitements de la drépanocytose

Pour la plupart des patients, la prise en charge de la SCD s'articule autour de la prévention et d'un suivi régulier. En effet, un suivi médical régulier permet d'évaluer l'évolution de la maladie et les dégâts qu'elle cause sur les organes. Les fonctions rénale et respiratoire sont particulièrement suivies. Un doppler transcrânien est régulièrement réalisée pour suivre les flux sanguins dans les artères du cerveau. Des flux trop rapides indiquent un risque d'AVC et entrainent la mise en place d'un programme transfusionnel de prévention.

1) Echanges transfusionnels

Les transfusions chroniques de GRs, administrées sous forme de transfusions simples ou d'échange transfusionnels, font partie de la prise en charge d'un certain nombre de complications de la drépanocytose, telles que la prévention primaire des AVC chez les enfants présentant des dopplers transcrâniens anormaux (Balkaran et al., 1992; Ohene-Frempong et al., 1998; Powars et al., 1978; Russell et al., 2021). Il y a 25 ans que les transfusions d'érythrocytes ont été utilisées pour la première fois ; elles permettent de corriger les complications cliniques aigües telle que la crise aplasique, l'AVC, le STA, et de supprimer l'érythropoïèse falciforme, de soulager l'anémie, d'augmenter la capacité de transport d'oxygène et de diminuer le pourcentage d'HbS (Balkaran et al., 1992; Ellison & Shaw, 2007; Powars et al., 1978).

Les échanges transfusionnels ont réduit les complications et amélioré la qualité de vie des personnes atteintes de SCD mais ne sont pas sans complications potentiellement graves. En

effet, ils connaissent leurs limites. Ces transfusions chroniques ne sont pas totalement efficaces car 10 % à 20% des patients auront un autre AVC. De plus, les transfusions peuvent transmettre des infections. Chaque unité de sang comporte un risque faible et limité mais pas inexistant de transmission d'agents infectieux comme le virus de l'immunodéficience humaine et les virus de l'hépatite (Schreiber et al., 1996). Dans une étude, parmi 184 patients pédiatriques qui ont reçu de multiples transfusions érythrocytaires, 14 enfants ont développé des autoanticorps érythrocytaires (Castellino et al., 1999). Les transfusions conduisent aussi à une accumulation de fer (Files et al., 2002). Une thérapie alternative pour prévenir la récidive d'AVC est nécessaire, en particulier une thérapie qui améliore également le traitement de la surcharge en fer. Enfin, ces interventions sont difficiles à étendre dans les zones à forte prévalence de SCD suite à une disponibilité et/ou un accès aux soins de santé limités (Piel et al., 2017).

2) L'hydroxyurée (HU)

Appelé aussi hydroxycarbamide, l'hydroxyurée est un médicament devenu depuis 1995 le traitement thérapeutique de référence dans la drépanocytose car c'est le seul médicament efficace qui ait fait ses preuves pour réduire la fréquence des épisodes douloureux (environ 50%) à la fois chez les adultes, les adolescents et les enfants (Steinberg et al., 2003). Ce traitement a permis de grandement améliorer la qualité de vie des patients, d'augmenter leur espérance de vie, mais il est aussi controversé par les effets toxiques qu'on lui connait. Nous développerons en détails le rôle et les différents effets de cette molécule d'hydroxyurée qui réveille la synthèse de l'hémoglobine fœtale (HbF) dans le chapitre n°2 de ce manuscrit.

3) Greffe de moelle osseuse

Un traitement curatif disponible actuellement contre la SCD est la greffe de moelle osseuse (appelée aussi allogreffe). L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques est développée depuis une quinzaine d'années pour des formes sévères de maladies auto-immunes. La greffe de moelle osseuse chez les patients drépanocytaires consiste à remplacer la moelle qui fabrique les GRs falciformes par une moelle saine prélevée sur un membre de la famille compatible qui fabriquera des GRs normaux.

L'allogreffe est un traitement lourd avec une hospitalisation d'au moins six semaines pendant lesquelles le risque d'infection et de potentielles complications est élevé parce que le

patient est sans défenses immunitaires durant cette période. Celle-ci n'est à envisager qu'en cas de forme très grave, lorsque les patients sont jeunes et ayant un donneur compatible dans leur fratrie (HLA-identique). Ainsi, la plupart des transplantations de cellules souches réussies pour la SCD ont été limitées aux procédures chez les enfants grâce à l'utilisation d'un conditionnement myéloablatif et de donneurs frères et sœurs parfaitement adaptés (Angelucci et al., 2014). Ces différents éléments expliquent que seulement quelques centaines de patients dans le monde ont pu recevoir cette greffe. En effet, une étude rapporte que moins de 18% des patients ont accès à un donneur apparié (Bernaudin et al., 2007; Bhatia & Walters, 2008).

A l'heure actuelle, la recherche concernant la thérapie génique à partir d'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques connait des avancées exceptionnelles dans le traitement de la SCD, elle a désormais montré son efficacité avec la rémission d'un patient drépanocytaire (Ribeil et al., 2017). Le vecteur de la thérapie génique utilisé chez l'adolescent en question est un lentivirus (LentiGlobin BB305) codant pour l'HbAA-T87Q. Ce patient est en rémission clinique complète. Quinze mois après son intervention, son taux d'hémoglobine est normal avec une absence de crise associée à une expression d'environ 50 % de β-globine anti-polymérisation issue du vecteur. De plus, il présente une inhibition totale des phénomènes pathologiques drépanocytaires.

4) Voxelotor (GBT440)

Modulateur de l'hémoglobine, il augmente l'affinité de l'oxyhémoglobine, réduisant la polymérisation de l'hémoglobine et ainsi, la falciformation des GRs. Ce médicament fait actuellement l'objet de nombreuses études et est toujours en cours de développement (nouvelles molécules). Une étude basée sur une méthode de titration a révélé que le GBT440 restaure le mouvement des GRs et diminue la viscosité du sang, inhibant la polymérisation de l'HbS dans des conditions désoxygénées (Dufu et al., 2021; Dufu & Oksenberg, 2018; Metcalf et al., 2017). Une première étude chez l'homme a évalué l'innocuité et la tolérance du GBT440 sur des patients volontaires sains et des patients volontaires drépanocytaires. Une dose de Voxelotor et un placebo pour les patients contrôles ont été administrés une fois par jour pendant 15 jours (Hutchaleelaha et al., 2019). Les résultats établissent une preuve de mécanisme sur l'augmentation de l'affinité avec l'oxyhémoglobine : augmentation de la concentration en hémoglobine, réduction des marqueurs d'hémolyse tels que réticulocytes, bilirubine indirecte, LDH, et réduction du nombre de GRs falciformés (Howard et al., 2021; Vichinsky et al., 2019).

L’augmentation de la concentration en hémoglobine pourrait réduire le besoin de transfusion et par conséquent le risque de surcharge en fer. En revanche les autres effets positifs directs de cette augmentation ne sont pas encore connus et des études supplémentaires sont nécessaires.

5) Crizanlizumab

Crizanlizumab est une substance pharmacologique administrée en perfusion intraveineuse (autorisée par la US FDA en 2019 et par l’agence Européenne des médicaments en 2020) (Novartis, 2020) qui permet de réduire la fréquence des CVO, et le potentiel adhésif des GRs et des cellules endothéliales (par l’inhibition de la sélectine P) chez les patients SCD de 16 ans et plus (Ataga et al., 2017). La sélectine P est un acteur essentiel dans la promotion de l’adhérence cellulaire entre les GRs, les leucocytes et les cellules endothéliales. En se liant à la P-sélectine de l’endothélium activé, le Crizanlizumab bloque les interactions entre cellules endothéliales, les plaquettes, les GRs et les leucocytes, limitant le risque d’emprisonnement de cellules et l’obstruction des vaisseaux (Novartis, 2020).

L’utilisation de Crizanlizumab combinée à l’HU (développé ci-dessus et dans le chapitre n°2) a permis de réduire le taux annuel de crise comparé à l’HU tout seul, mettant en avant un effet complémentaire des deux interventions (Ataga et al., 2017). Or, les deux substances pharmacologiques n’ont pas les mêmes mécanismes d’action. L’HU agit plus précisément sur l’hémoglobine tandis que le Crizanlizumab agit sur le système vasculaire (Kutlar et al., 2019).

6) Autres traitements

La L-glutamine a récemment été approuvée par la FDA pour la prévention des complications aiguës de la SCD. La glutamine a un effet antioxydant, elle élimine les molécules qui endommagent les cellules. Cependant, il existe de nombreuses lacunes dans la compréhension du rôle biologique de la glutamine et de ses implications thérapeutiques dans la SCD. Des études plus vastes et à plus long terme sont nécessaires pour évaluer l'impact de la glutamine sur de nombreux résultats cliniquement pertinents y compris la mortalité (Sadaf & Quinn, 2020).

Chapitre 2 : L'hydroxyurée (HU)

La greffe de moelle osseuse allogénique (BMT, pour « bone marrow transplantation » en anglais) reste la seule thérapie curative (avec la thérapie génique) dans les cas de drépanocytose sévère. Or, chez les patients n'ayant pas de frère avec HLA identique, ou refusant la procédure de greffe, ou trop âgés pour la greffe, ou chez lesquels une contre-indication existe, l'hydroxyurée (HU) reste le médicament le plus utilisé pour traiter les patients. Il a été prouvé qu'il modifie la maladie à court ou moyen terme avec une toxicité acceptable (Ferster et al., 1992, 2001; Vermylen et al., 1988). Devenu le traitement thérapeutique de référence, l'HU est le seul médicament efficace qui ait fait ses preuves pour réduire de 50% la fréquence des épisodes douloureux à la fois chez les adultes, les adolescents et les enfants (Agrawal et al., 2014). Cependant, les effets du traitement de la drépanocytose par l'hydroxyurée sur l'aptitude physique, la surface musculaire, la microvascularisation et le profil énergétique, ne sont que partiellement connus. Nous verrons donc à travers ce chapitre, les effets et les bénéfices de l'HU mais aussi nous essayerons de comprendre ses limites.

I. Généralités

L'expérience clinique de l'HU s'accumule depuis plus de 35 ans concernant l'innocuité et l'efficacité de la thérapie pour les patients SCD (Platt et al., 1984). En effet, l'HU appelée aussi hydroxycarbamide, a été testée pour la première fois dans la drépanocytose en 1984. L'HU est un antimétabolite qui appartient à une classe de composés appelés « acides hydroxamiques » qui peuvent lier les métaux. Le principal effet cytotoxique de l'hydroxyurée réside dans sa capacité à inhiber la ribonucléotide réductase (RR, enzyme qui catalyse la conversion des ribonucléotides en désoxyribonucléotides) empêchant la réplication de l'ADN en se liant aux deux molécules de fer de la réductase et en inactivant un radical tyrosyle critique (Snyder, 1984).

Cet effet cytotoxique de l'HU réduit la production de GRs. Ce médicament réduit également le nombre de globules blancs et de plaquettes, réduisant potentiellement leur rôle dans les lésions vasculaires (Saleh et al., 1999).

II. Modalités de prise de l'hydroxyurée (HU)

L'âge idéal pour initier l'HU dans la drépanocytose n'est pas encore défini, mais les baisses physiologiques de l'hémoglobine fœtale (HbF) suggèrent que le traitement préventif devrait commencer dès le plus jeune âge (Ware, 2010). Avant de commencer le traitement, il est important d'obtenir un bilan sanguin complet et d'établir le taux d'HbF, la fonction hépatique et la fonction rénale de base du patient. L'HU est recommandée uniquement pour les patients drépanocytaires répondant à un certain nombre de critères. En effet, sont concernés :

- Les patients ayant au moins 3 épisodes de douleur modérée à sévère sur une période de 12 mois ;
- Les patients ayant des antécédents d'accident vasculaire cérébral (AVC) et une contre-indication aux transfusions chroniques ;
- Les enfants ayant des antécédents de syndrome thoracique aigu (STA) ou d'anémie symptomatique ;
- Les nourrissons et les enfants âgés de 9 mois ou plus qui sont asymptomatiques ou qui ont des épisodes de douleur peu fréquents (Gardner, 2018).

Le médicament se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche, inodore, à plusieurs synonymes chimiques. Il est facile à administrer puisqu'il se prend par voie orale, une fois par jour. La dose initiale est de 15 mg par kilogramme de poids corporel par jour (sauf si la clairance de la créatinine est < 60 ml par minute, auquel cas la dose initiale est de 7,5 mg par kg par jour). L'HU doit être administrée avec des doses maximales tolérées comprises entre 20 et 30 mg/kg (Steinberg et al., 2003). Les doses optimales fournissent un équilibre entre les effets toxiques hématologiques et les concentrations accrues de HbF, la dose tolérée la plus élevée produisant la réponse la plus élevée (Wang et al., 2002). Enfin, il n'est pas approuvé par la Food and Drug Administration pour la prévention des crises (Charache et al., 1995).

III. Tolérance de l'hydroxyurée (HU)

Les effets négatifs potentiels de l'HU sont à observer à court (durant les 6 mois suivants le début du traitement) et long termes (plus de 6 mois après le début du traitement), et semblent être liés à son interférence avec les cellules à division rapide en particulier les cellules sanguines nouvellement formées (Brawley et al., 2008).

1) Impact à court terme

A court terme, on distingue des effets secondaires affectants les trois lignées cellulaires avec :

- Une diminution du nombre de leucocytes (impliquées dans la lutte contre l'infection),
- Une diminution du nombre de plaquettes (impliquées dans la lutte contre le saignement),
- Une diminution du nombre d'érythrocytes (anémie) et,
- Une diminution du nombre de réticulocytes (Singh & Xu, 2016).

Cela semble provoquer aussi un assèchement de la peau, un assombrissement de la peau et des ongles, des nausées, des maux de têtes, et une légère augmentation de la créatinine.

2) Impact à long terme

a) Fertilité et grossesse

A long terme, des malformations congénitales ont été rapportées. D'ailleurs, le médicament n'est généralement pas prescrit aux femmes enceintes car il pourrait potentiellement avoir des effets néfastes sur la fertilité et la grossesse (Liebelt et al., 2007).

Pourtant, une cohorte prospective à long terme de 94 femmes drépanocytaires pendant leur grossesse a eu un grand nombre de résultats normaux. Ceci suggère que l'exposition fœtale à des doses thérapeutiques d'hydroxyurée ne provoque pas de changements tératogènes pendant la grossesse et permet d'aboutir à de belles naissances, qu'elles soient à terme ou prématurées (Ballas et al., 2009). Les enfants nés des patients sous HU n'ont montré aucun signe de malformations congénitales ou d'anomalies du développement à ce jour.

Une publication a rapporté des paramètres spermatiques anormaux chez les hommes adultes atteints de SCD sous traitement par l'hydroxyurée susceptibles de provoquer l'infertilité ou tératogénicité (Berthaut et al., 2008). Dans cette analyse rétrospective, la plupart des patients présentaient un nombre ou une fonction anormale des spermatozoïdes avant de commencer l'hydroxyurée. Ainsi il est difficile de déterminer la contribution de l'HU à ces résultats anormaux.

b) Mutagénicité et cancérogénicité

D'autres inquiétudes ont été exprimées notamment la peur de la mutagénicité et de la cancérogénicité chez les patients susceptibles de recevoir un traitement de plusieurs décennies (Charache et al., 1995). En bloquant la synthèse de l'ADN, l'HU supprime la leucocytose et la thrombocytose ce qui peut être un risque potentiellement accru de cancers.

c) Des risques chez les enfants

Chez le jeune enfant, dans l'étude de Wang et collaborateurs, la toxicité était limitée à une neutropénie légère à modérée (Wang et al., 2011) mais une autre crainte concernerait les effets de l'HU sur la croissance. Bien qu'une faible croissance chez des souris traitées avec des doses très élevées de HU intrapéritonéale ait été suggérée, des études sur un petit nombre d'enfants drépanocytaires traités par HU orale n'ont montré aucun effet indésirable sur la croissance (Maier-Redelsperger et al., 1999). En réalité, les effets toxiques liés à l'hydroxyurée sont légers et réversibles, et la plupart des enfants tolèrent l'HU sans difficulté (Ware, 2010). Des études pilotes ont montré l'innocuité de l'HU chez les nourrissons (Wang et al., 2002) et les tout-petits (Thornburg et al., 2009).

IV. Efficacité de l'hydroxyurée (HU)

1) Les bénéfices et les effets biologiques

Dans les études menées auprès d'adultes ou d'enfants homozygotes, le traitement par l'HU a réduit la fréquence des crises douloureuses, des STA, des taux d'admission à l'hôpital, et des transfusions sanguines (Stettler et al., 2015; Voskaridou et al., 2010; Wang et al., 2011; Wong et al., 2014; Yawn et al., 2014). En effet, Charache et collaborateurs (Charache et al., 1995) ont démontré l'efficacité de l'HU pour réduire la morbidité chez les adultes SCD. Au total, 299 adultes qui avaient eu au moins trois crises douloureuses au cours de l'année précédente ont été randomisés pour recevoir soit de l'HU soit un placebo. L'incidence des crises douloureuses est passée d'une médiane de 4,5 par an à 2,5 par an. Les taux de STA et de transfusion sanguine ont également été considérablement réduits. Un suivi observationnel de 233 des 299 sujets d'origine a été effectué pendant une période allant jusqu'à 9 ans et a montré une réduction de 40% de la mortalité chez ceux qui ont reçu de l'HU.

Les bénéfices cliniques des effets biologiques de l'HU ne se manifestent pas avant plusieurs mois et son utilisation doit être soigneusement surveillée (Charache et al., 1995). Finalement l'HU aurait une action multimodale sur la SCD développée ci-dessous (Matte et al., 2019) (Figure 10).

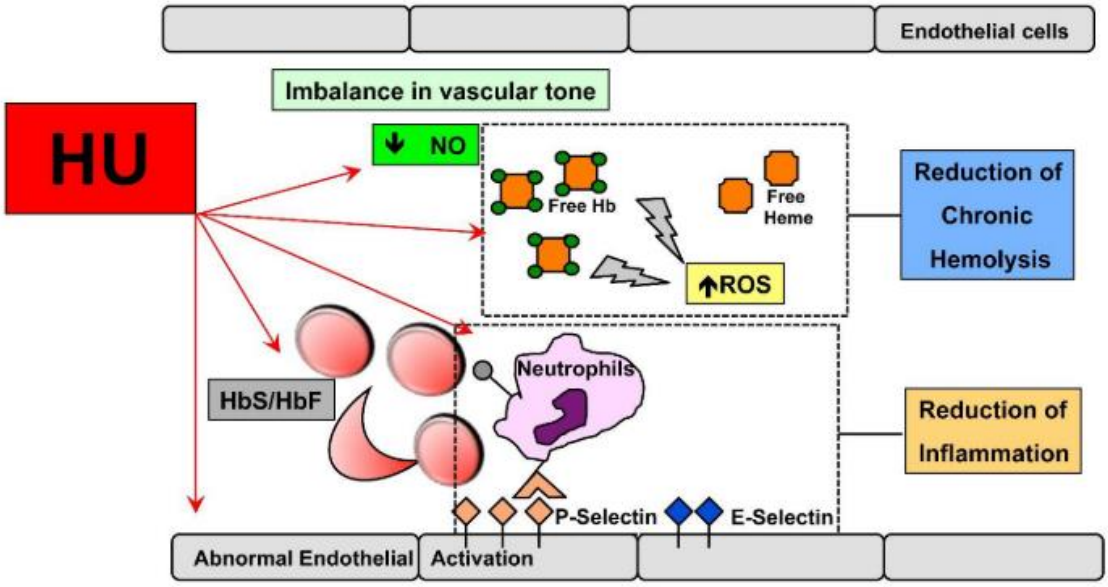


Figure 10 : Schéma de l'action multimodale sur la SCD (Matte et al., 2019).

a) Impact sur l'hémoglobine fœtale (HbF)

Il a été prouvé en laboratoire par de nombreuses études que l'HU multiplie par deux la production d'HbF. En effet, l'utilisation de l'HU dans le traitement de la SCD a été d'abord basée sur sa capacité à augmenter la synthèse de l'HbF (Charache et al., 1995; Marahatta & Ware, 2017; Platt, Brambilla, et al., 1994; Wang et al., 2011; Ware et al., 2004). De ce fait, chez les patients répondeurs à l'hydroxyurée, le nombre de GRs contenant de l'hémoglobine fœtale et la quantité d'HbF par globules rouges augmentent, réduisant ainsi la présence d'HbS. L'HU contribue donc à diminuer le nombre de cellules falciformes en circulation (Brawley et al., 2008). Il a été mis en évidence des augmentations HU dose-dépendantes de la concentration d'HbF, du pourcentage d'HbF et de la moyenne du volume corpusculaire moyen des GRs (Charache et al., 1992). L'induction pharmacologique de l'HbF est un objectif logique pour le traitement de la SCD. En effet, de nombreux traitements peuvent augmenter les concentrations d'HbF mais la plupart sont toxiques et ne sont pas réalisables pour une thérapie à long terme contrairement à l'hydroxyurée.

Des mécanismes d'action supplémentaires pour l'induction de l'HbF ont été proposés pour l'HU, notamment la formation de radicaux libres, la chélation du fer, et l'activation de la guanylyl cyclase soluble (Ware, 2010). L'activation de la guanylate cyclase soluble augmente la guanosine monophosphate cyclique qui sert de second messager et assure la médiation de diverses réponses physiologiques comme la relaxation des muscles lisses, l'inhibition de l'adhérence plaquettaire et l'induction de la production d'HbF (Ikuta, 2001).

b) Impact sur la ménopause chez les femmes

La littérature expose très peu de choses sur la ménopause chez les patientes atteintes de drépanocytose principalement car l'espérance de vie médiane des femmes SCD est d'environ 48 ans (Platt, Brambilla, et al., 1994). A mesure que l'espérance de vie des patients SCD augmente progressivement, des études se sont intéressées notamment à l'impact de l'hydroxyurée sur la ménopause. Les résultats ont montré que l'âge moyen de la ménopause chez les femmes prenant de l'HU avait tendance à être encore plus bas que celui des femmes ne prenant pas le traitement. Ceci est cohérent avec la découverte selon laquelle l'HU diminue l'hormone antimüllérienne (AMH) chez les femmes drépanocytaires, ce qui, à son tour, diminue la réserve ovarienne associée à la ménopause précoce (Elchuri et al., 2015; Kopeika et al., 2019).

c) Une augmentation des taux d'hémoglobine et des valeurs d'hématocrite

L'HU est déjà utilisé depuis des décennies pour réduire l'hématocrite anormalement élevé et le nombre de plaquettes chez les patients atteints de polycythémie, rare trouble de croissance de la moelle osseuse (Letvin et al., 1989). Dans la drépanocytose, le traitement sous HU engendre de nombreux changements morphologiques et physiologiques des érythrocytes permettant la diminution des taux de crises. En effet, le médicament peut augmenter à la fois le nombre et la taille des érythrocytes dans la circulation, et peut ainsi diminuer le taux d'hémolyse, libérant l'hémoglobine dans le plasma sanguins chez les patients drépanocytaires (Hackney et al., 1997).

d) Baisse de l'hémolyse

La libération d'hémoglobine est délétère chez le patient. L'hémolyse est responsable de la diminution de la biodisponibilité du NO (Chirico & Pialoux, 2012; Kato et al., 2009, 2017) ainsi, elle va renforcer la dysfonction endothéliale et diminuer le tonus vasculaire, aboutissant fréquemment à des complications telles que la vasculopathie cérébrale, l'hypertension pulmonaire, le priapisme (érection prolongée douloureuse et irréductible survenant en dehors de toute stimulation sexuelle) ou encore des ulcères de jambe (Kato et al., 2017). La baisse de l'hémolyse est importante car elle signifie que la libération d'hémoglobine dans le plasma sanguin est diminuée chez les patients drépanocytaires (Hackney et al., 1997) et permettrait donc d'éviter ces complications.

e) Impact sur l'oxyde nitrique (NO)

Une augmentation de la production d'oxyde nitrique (NO) pourrait également être impliquée dans l'effet bénéfique de l'HU (Gladwin et al., 2002; Nahavandi et al., 2000, 2002). L'oxyde nitrique a des effets bénéfiques sur l'endothélium vasculaire y compris la vasodilatation locale, et pourrait donc aider à compenser la diminution de la biodisponibilité du NO due à l'hémolyse (Ware, 2010).

Il a également été suggéré que l'HU pourrait améliorer le flux sanguin et l'oxygénation des tissus chez les patients drépanocytaires en augmentant le niveau de l'oxyde nitrique (NO) (Gladwin et al., 2002; Nahavandi et al., 2002). La production de NO peut également compenser la perte d'oxyde nitrique endogène en raison d'une hémolyse intravasculaire (Cokic et al., 2003).

f) Effets sur la masse corporelle

Dans une étude (Charache et al. 1995), le traitement de la drépanocytose sous HU pendant 24 semaines a donné lieu à une augmentation du volume corporel. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors d'un des tout premiers essais cliniques avec HU pour lesquels les patients SCD ont démontré non seulement une augmentation de la survie des érythrocytes mais également une augmentation substantielle du poids corporel (Charache et al., 1992).

Une autre étude s'est intéressée aux effets de l'administration d'HU sur la masse corporelle et la composition corporelle (Hackney et al., 1997). Il s'est avéré qu'après 18 mois de traitement, les sujets traités par HU ont présenté une augmentation de la masse corporelle plus importante que les sujets témoins, soit 3,16 kg contre 1,82 kg. Les auteurs précisent que le gain de masse corporelle était d'environ 60 % de tissu maigre et d'environ 30 % de tissu adipeux, mais ces réponses étaient assez variables au sein des deux groupes, et aucune différence significative n'a pu être démontrée dans l'un ou l'autre des paramètres.

g) Impact sur les performances physiques

Le déconditionnement musculaire des patients drépanocytaires est un élément majeur de leur faible autonomie et de leur qualité de vie, les rendant ainsi sédentaires. Hackney et collaborateurs ont également évalué les effets bénéfiques du traitement à l'HU sur les performances physiques et les réponses à l'exercice des patients.

Des tests d'effort anaérobie ont été effectués à l'aide d'un protocole de Wingate sur ergomètre. Après une période d'échauffement de 3 minutes sur l'ergomètre, chaque sujet devait pédaler le plus rapidement possible (80-120 tours/min) sans qu'aucune résistance ne soit engagée. Une fois que les sujets avaient atteint leur cadence de pédalage maximale, la performance a été évaluée par un test de 20 secondes à une intensité maximale contre une résistance de 7,5% du poids corporel, utilisé comme critère de performance maximale (MEP) (protocole Wingate). Le test d'exercice aérobie a été réalisé à partir d'un protocole d'ergomètre à cycle d'intensité sous-maximale et graduée : le sujet pédalait pendant 1 minute sans résistance suivi de 3 minutes contre une résistance de 25 W, 3 minutes contre une résistance de 50 W et 3 minutes contre une résistance de 75 W. Enfin, un protocole d'exercice sous-maximal à l'état stable, soit 10 minutes sur cycloergomètre, a été utilisé comme critère de performance sous-maximale (SEP).

Au départ, aucune différence significative dans aucun de ces paramètres n'a été trouvée entre les groupes traités par HU et placebo, mais de nouveau après 18 mois de traitement il a été observé :

- Une augmentation de la puissance musculaire maximale pendant la MEP (104,9 W contre 57,7 W dans le groupe témoin) ;

- Une diminution de la fréquence cardiaque (FC) pendant la SEP de 15,2 battements/min (contre 4,3 battements/min chez les patients sous placebo) témoignant d'une amélioration des performances sous-maximales (c'est-à-dire de l'endurance).

Pris ensemble, le gain de poids global et l'augmentation des performances (pendant les épreuves maximales et sous-maximales de l'étude) fournissent des données objectives pour soutenir l'idée que l'administration de l'HU produit une amélioration de la capacité physique des patients drépanocytaires. Pour la même quantité de travail en aérobie, les patients présentaient une FC inférieure à celle de départ ce qui révèle une amélioration de l'efficacité cardiovasculaire pour cet exercice de type aérobie (Hackney et al., 1997). Une augmentation absolue de la puissance musculaire maximale totale suggère une augmentation de la capacité anaérobie, et donc une amélioration fonctionnelle de la performance musculaire (Figure 11). L'ensemble de ces améliorations peuvent se traduire par une capacité accrue à mener ces activités quotidiennes comme monter les escaliers, ou soulever des objets.

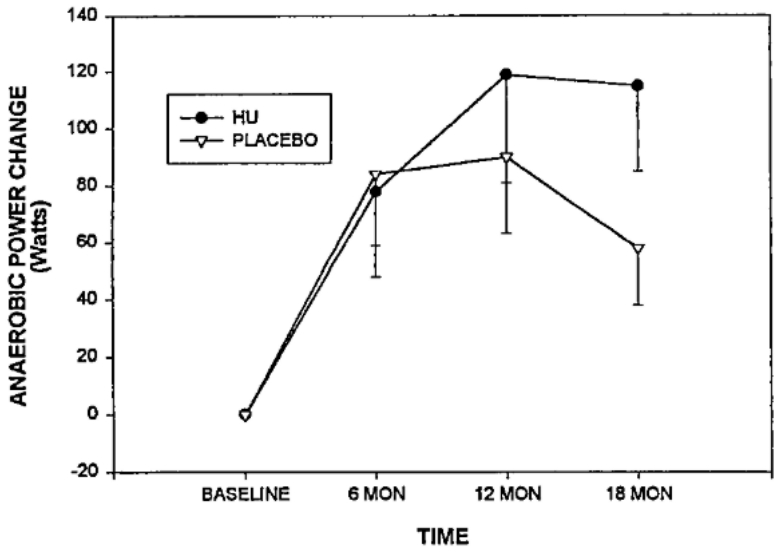


Figure 11 : Changements dans les réponses de puissance anaérobie au test « Wingate » pour les sujets traités par HU et placebo au cours des 18 mois de l'étude (Hackney et al., 1997).

Pour des raisons qui ne sont pas totalement claires, cette amélioration de la capacité anaérobie des sujets traités à l'HU était considérablement plus importante chez les hommes que chez les femmes.

h) Des effets à long et court terme sur l'oxygénation cérébrale

Dans une étude, Tavakkoli et ses collaborateurs (Tavakkoli et al., 2005) ce sont intéressés aux effets du traitement par l'HU sur l'oxygénation cérébrale des patients SCD, à long terme (supérieur à 6 mois) et à court terme. Leurs résultats ont montré une augmentation significative mais non normalisée de l'oxygénation cérébrale (rSO_2) associée à l'HU. En revanche, une seule dose d'HU, seule ou en combinaison avec de l'oxygène inhalé ne semblait pas influencer l'oxygénation cérébrale. Les auteurs attribuent cette amélioration de rSO_2 à une amélioration du flux sanguin via une inhibition de la polymérisation de l'HbS, notamment due à une augmentation de l'HbF qui accompagne l'administration d'HU. L'apport en oxygène est primordial pour les tissus, et en particulier pour le tissu musculaire, car celui-ci a une forte consommation d'O_2 lorsqu'il est en activité. Si le traitement à long terme par l'HU était associé à une oxygénation cérébrale significativement plus élevée, elle restait néanmoins inférieure à la normale (Tavakkoli et al., 2005).

2) Effets de l'hydroxyurée chez les enfants drépanocytaires

Chez les enfants, en particulier chez les nourrissons, l'HU préserve leur fonction splénique (production des lymphocytes et destruction des cellules rouges anormales) (Roy et al., 2017). L'HU a été associée à une croissance et un développement excellent. Des bénéfices cliniques à long terme ont également été observés avec moins d'événements douloureux et d'hospitalisations. Dans cette même étude qui a suivi l'évolution de ces mêmes nourrissons, la maturation sexuelle, y compris les premières règles, s'est produite sans retard apparent.

Une étude a été réalisée chez de jeunes garçons (âgés de 10.4 à 14.6 ans) (Wali & Moheeb, 2011) et a révélé que le traitement à l'HU améliorait la tolérance à l'exercice et la plupart des paramètres de conditionnement physique. Il a aussi été rapporté une diminution significative des valeurs de FC. En effet, ceux-ci passaient plus de temps sur le tapis de course avant de ressentir la fatigue par rapport à leurs performances précédentes et par rapport aux sujets contrôles. Ces résultats supposent qu'il y a eu une amélioration de la performance cardiovasculaire, de la réserve et de la fonction cardiovasculaires de ces patients, d'où la diminution significative de la FC moyenne sur le tapis roulant et leur tolérance globale à l'exercice aérobie.

Chapitre 3 : Le muscle strié squelettique

Le muscle strié squelettique est, par définition, le muscle qui se fixe au squelette par l'intermédiaire du tendon et permet le mouvement dans une direction bien définie grâce à sa fonction essentielle de contraction, rendue possible par les myocytes organisés en faisceaux et formant le muscle. Le muscle strié squelettique est donc le composant essentiel du système locomoteur. Ce chapitre n°3 fera aussi l'état des lieux des répercussions de la SCD sur ce tissu.

I. Généralités sur le muscle strié squelettique

1) Rappel sur l'architecture structurale du muscle strié squelettique

Des faisceaux de fibres musculaires et des enveloppes conjonctives (épimysium, périmysium et endomysium) composent et délimitent l'essentiel du muscle strié squelettique (Figure 12). Ces différentes couches de tissus permettent le maintien de la structure musculaire et englobent les fibres à l'intérieur du muscle. Chaque muscle squelettique est fourni en vaisseaux sanguins contribuant aux apports énergétiques, à l'apport en oxygène ainsi qu'à l'élimination des déchets. Le système nerveux est la seule possibilité pour créer une contraction du muscle squelettique, contrairement aux muscles lisses et cardiaques.

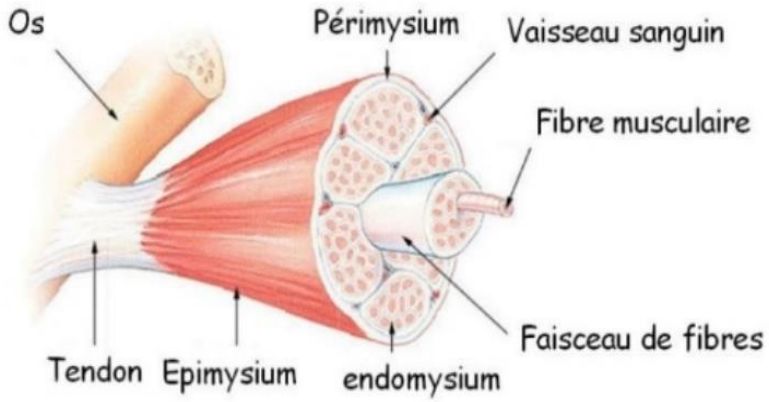


Figure 12 : Organisation tissulaire du muscle strié squelettique.

Ces fibres musculaires sont de formes cylindriques d'un diamètre de 10 à 100 µm, allongées (pouvant atteindre 30 cm) et juxtaposées les unes à côté des autres, parcourant en parallèle toute la longueur du muscle, et entre chaque insertion tendineuse (Lieber et al., 1992).

Elles sont chacune formées de quelques milliers de myofibrilles, leur permettant de se contracter et de structures non contractiles telles que les mitochondries, le réticulum sarcoplasmique (qui permet de stocker, relâcher et récupérer les ions calcium), le sarcolemme (membrane plasmatique entourant les myocytes), des enzymes et des substrats métaboliques, permettant tous l'activité contractile. Ces myofibrilles (diamètre approximatif de 1,2 µm) sont constituées de sarcomères, deux types de filaments protéiques disposés en série donnant cet aspect strié, et qui part leurs alignements, permettent la contraction musculaire. Il s'agit des filaments fins d'actine positionnés en périphérie du sarcomère et des filaments épais de myosine, disposés au centre du sarcomère sur toute la longueur de la bande A. La contraction musculaire est le résultat de plusieurs étapes, plus précisément, du couplage excitation – contraction et du glissement des filaments fins d'actine sur les filaments épais de myosine (Figure 13).

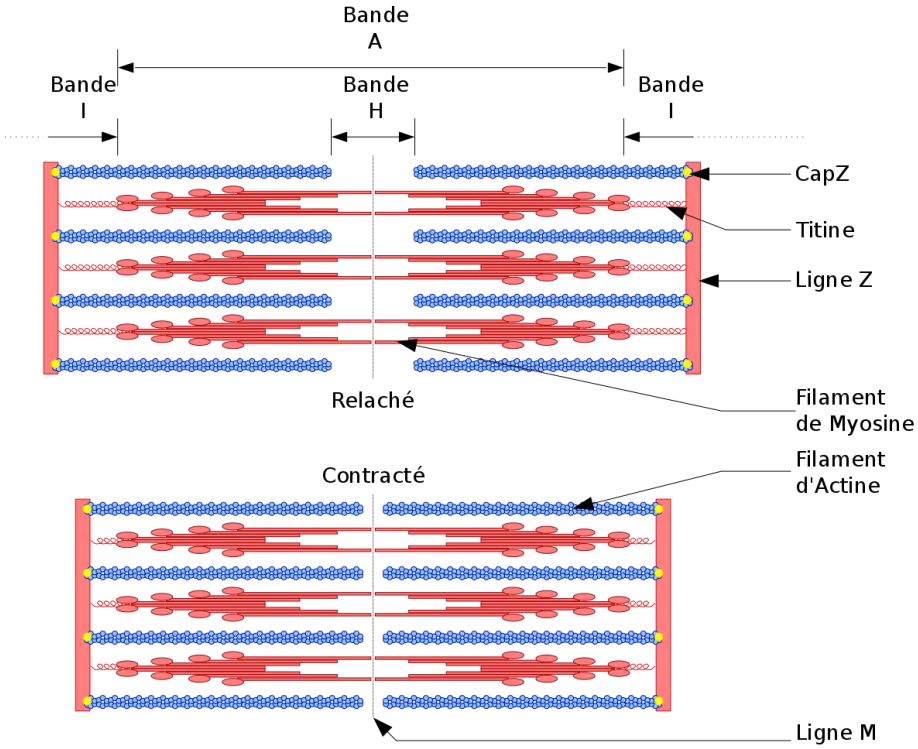


Figure 13 : Détails du sarcomère.

Chez l'homme, plusieurs types de fibres sont distinguées par leurs caractéristiques neuromusculaires, morphologiques, microvasculaires et métaboliques, qui leurs confèrent des propriétés contractiles ou plus globalement fonctionnelles différentes :

- Les fibres musculaires de type I. Elles sont de petit diamètre, avec un nombre important de capillaires en contact, une forte concentration en myoglobine et riche en

mitochondrie. Elles produisent une contraction lente, prolongée, très résistantes à la fatigue mais de force modeste. Cette production d'énergie durable repose essentiellement sur le système oxydatif ;

- Les fibres musculaires de type IIx. Elles sont rapides, d'un diamètre plus important que les I. Elles sont peu équipées en myoglobine, peu vascularisées et pauvres en mitochondries. Elles produisent une contraction rapide, explosive, de force élevée mais ces fibres sont très fatigables. La production d'énergie repose essentiellement sur les voies glycolytiques non-oxydatives. Les fibres de type IIx ont une force contractile de 10 à 20 % supérieure à celle des fibres de type I (Bottinelli et al., 1999), elles sont idéales pour les activités nécessitant de la vitesse, comme le sprint, ou les mouvements à force élevée, comme l'haltérophilie.

- Les fibres de type IIa sont également des fibres rapides mais qui possèdent des caractéristiques intermédiaires aux I et IIx (Egan & Zierath, 2013).

L'évolution des techniques d'analyse permet aujourd'hui de distinguer des fibres aux propriétés mixtes aboutissant à une nomenclature plus complexe classant les fibres en types I, I-IIa, IIa, IIa-IIx et IIx. Le tableau 14 reprend les différentes caractéristiques propres à chaque fibre.

La proportion des différents types de fibres est en partie déterminée génétiquement mais un entraînement régulier, selon la fréquence, le temps de récupération de la séance, les durées de répétitions du sprint et la charge générale sur un muscle, est susceptible d'influencer les adaptations contractiles (Patterson et al., 2006; Ross & Leveritt, 2001; Sillen et al., 2013). Une étude sur des athlètes de haut niveau a montré que les sprinters avaient environ 24% de fibres de types I alors qu'un coureur de fond de haut niveau en possède environ 79%, au niveau du quadriceps (Wilmore et al., 2008).

	Type I	Type II	
		Type IIa	Type IIx
General Properties			
Alternative nomenclature	SO, ST	FOG, FTa	FG, FTb
Myosin heavy-chain isoform	MHC1	MHC2A	MHC2X
Contractile and metabolic characteristics	Slow twitch, high oxidative, fatigue resistant	Fast twitch, oxidative-glycolytic, fatigue resistant	Fast twitch, glycolytic, fast fatigable
Force production (power output)	Weak	Intermediate	Strong
Endurance capacity	High	Intermediate	Low
Appearance/myoglobin content	Red/high	Red/intermediate	White/low
Time to peak tension [a]	80	30	
Ca^{2+} actomyosin ATPase activity [b]	0.16	0.48	
Mg2+ actomyosin ATPase activity [c]	0.30	0.84	
Recruitment threshold	All intensities	>40%VO_{2max}	>75%VO_{2max}
Morphological Properties			
Capillary density (capillaries per fiber)	4.2	4.0	3.2
Mitochondrial density	High	Intermediate	Low
Fiber size (cross-sectional area) [d]	5310	6110	5600
Percent distribution in whole muscle	54.0 ± 12.2 (50–55)	32.3 ± 9.1 (30–35)	13.0 ± 7.6 (10–20)
Myonuclear domain size	Small	Intermediate	Large
Glycolytic and Oxidative Enzyme Activities[e]			
Creatine kinase	13.1	16.6	
Phosphofructokinase	7.5	13.7	17.5
Glycogen phosphorylase	2.8	5.8	8.8
Lactate dehydrogenase	94	179	211
Citrate synthase	10.8	8.6	6.5
Succinate dehydrogenase	7.1	4.8	2.5
3-hydroxyl-CoA dehydrogenase	14.8	11.6	7.1
Metabolic and Substrate Properties			
Oxidative potential	High	Intermediate-high	Low
Glycolytic potential	Low	Intermediate-high	High
[Phosphocreatine] [f]	12.6	14.5	14.8
[Glycogen] [f]	77.8	83.1	89.2
[IMTG] [f]	7.1	4.2	
Exercise-type dominance	Prolonged low intensity	Moderate duration, high intensity	Short duration, maximal effort

Tableau 14 : Caractéristiques contractiles, métaboliques et morphologiques moyennes des différents types de fibres du muscle strié squelettique chez l'Homme. D'après (Egan & Zierath, 2013).

2) *Rappels sur le réseau microvasculaire du muscle strié squelettique*

Le système vasculaire comprend plusieurs types de vaisseaux (artères, artérioles, capillaires, veinules et veines) (Figure 15) et a pour fonction essentielle l'apport en oxygène et en nutriments aux tissus/cellules musculaires, et à l'évacuation des produits du métabolisme musculaire. Les artères, les artérioles, les capillaires, les veinules et les veines sont des vaisseaux qui composent le système vasculaire :

- Les artères et les artérioles transportent le sang riche en oxygène et en nutriments du cœur jusqu'aux capillaires où ont lieu les échanges avec le tissu musculaire. Les artérioles se ramifient à leurs extrémités en capillaires représentant les plus petits vaisseaux sanguins (diamètre d'environ 4,5 à 6 µm) (E. Eriksson & Myrhage, 1972) ;

- Les capillaires sont un véritable lieu d'échanges métaboliques (oxygène et de substrats énergétiques, et évacuation du CO_2 et des métabolites) entre le sang et le liquide interstitiel des cellules environnantes.

- Les veinules font suite aux capillaires et reconduisent le sang appauvri en oxygène et chargé en molécules [lactate, proton (H^+), phosphate inorganique (Pi)] vers les veines puis vers le cœur, les poumons et tout le reste de l'organisme. La particularité des veines est leur paroi fine conférant une faible résistance à l'écoulement du sang vers le cœur.

Ce système vasculaire d'approvisionnement participe aux mécanismes de résistance systémique et la microcirculation constituée de capillaires dont le diamètre est d'environ 8 µm. Ces structures hautement plastiques peuvent s'adapter aux diverses contraintes environnementales pour maintenir une perfusion adéquate en oxygène.

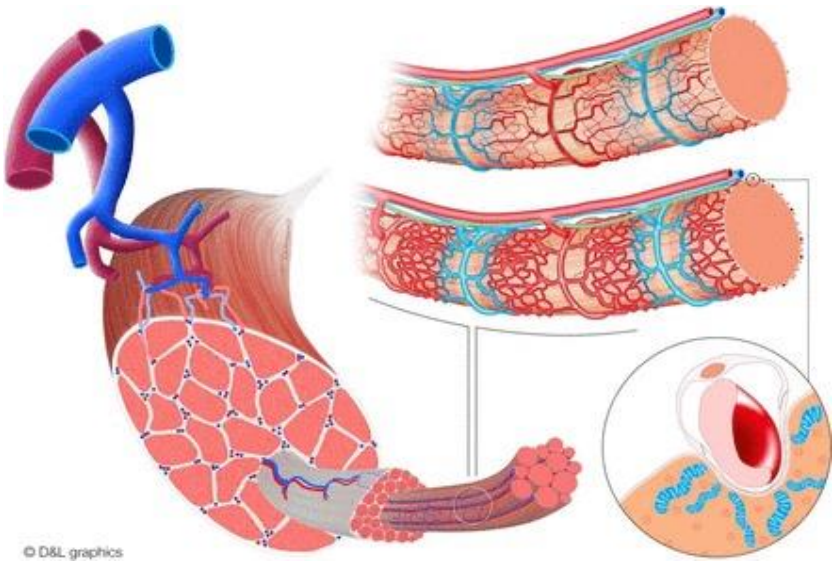


Figure 15 : Représentation schématique de l'architecture vasculaire du muscle.
À gauche : les artérioles bifurquent des artères primaires jusqu'aux artérioles terminales. En haut à droite : 2 fibres musculaires et leurs unités microvasculaires, avec des artérioles terminales (rouges) alimentant plusieurs capillaires (rouge à bleu) comme la plus petite unité de contrôle et des vaisseaux lymphatiques (vert) montant le long des artérioles et des veinules (bleu). En bas à droite : grossissement d'un capillaire intégré dans un « canal » de sarcolemme, élargissant ainsi la zone de contact entre les myocytes et les cellules endothéliales (Kusters & Barrett, 2016).

Chez l'homme, l'étude du réseau microvasculaire du muscle strié squelettique est le plus souvent effectuée sur des coupes transversales de 10 µm d'épaisseur issues de biopsies musculaires. Ils existent plusieurs techniques enzymatiques ou immunohistochimiques pour analyser les micro-vaisseaux mais la technique la plus couramment utilisée est le marquage immunohistochimique des molécules d'adhérence des cellules endothéliales plaquettaires par l'anticorps CD31 (Dako, Glostrup, Danemark) utilisée d'ailleurs dans les différentes études présentées dans cette thèse. Cette technique permet de mesurer différents indices morphométriques et fonctionnels comme la densité capillaire (DC) correspondant au nombre de capillaires dans une surface donnée (cap/mm²) et l'indice C/F correspondant au nombre de capillaires divisé par le nombre de fibres préalablement délimitées. Il est possible aussi de mesurer les indices d'interface tel que le nombre de capillaires au contact d'une fibre musculaire (CAF) et le nombre de capillaires autour d'une fibre, divisé par le périmètre de cette même fibre (capillary-to-fiber-perimeter exchange ratio (CFPE)) (Hepple et al., 1997). Le sharing factor permet de connaître le nombre de fibres partageant le même micro-vaisseau. Enfin, cette technique de marquage permet aussi de mesurer les indices fonctionnels tels que la distance/le domaine de diffusion en prenant en compte la surface des fibres (CAFA) et il correspond à la mesure de l'indice CAF divisée par la surface de section de la fibre (cap/µm^2). Puis, la surface d'échange disponible entre une fibre musculaire et les micro-vaisseaux qui l'entourent en divisant la somme des longueurs de capillaires au contact de la fibre (LC) par le périmètre de cette même fibre (PF) (LC/PF en %). Ce paramètre a également été utilisé comme un indice de la tortuosité capillaire (Charifi et al., 2004).

L'analyse morphométrique des capillaires comprend la mesure de leur longueur, de leur périmètre, de leur surface de section, leurs diamètres extérieurs et intérieurs moyens. Une analyse morphométrique plus poussée donne également un indice morphologique du réseau microvasculaire. Il s'agit de la tortuosité capillaire. Une tortuosité élevée permet d'augmenter la surface d'échange avec les fibres musculaires et le temps de transit du sang dans les capillaires au contact de ces fibres. Ainsi, Vincent et collaborateurs (2010) a proposé l'indice CapTor calculé par le rapport entre la surface de section réelle du capillaire et la surface de section fictive du micro-vaisseau dont le modèle serait un cylindre parfait courant parallèlement aux fibres (Vincent et al., 2010). Ainsi, sa mesure correspond à l'équation suivante : *CapTor = surface de section du capillaire/π (diamètre extérieur moyen/2)*². Plus ce ratio s'éloigne de 1 plus le capillaire est tortueux. Plus il se rapproche de 1, plus ce capillaire est droit et parallèle aux fibres musculaires.

3) *Rappel des caractéristiques énergétiques du muscle strié squelettique*

Organe majeur du corps humain, le muscle squelettique peut à la fois produire et consommer de l'énergie. La contraction du muscle nécessite l'utilisation d'une quantité importante d'énergie, provenant de la synthèse continue d'ATP, une molécule composée d'adénosine et combinée à 3 Pi (phosphate inorganique). L'enzyme ATPase rompt par hydrolyse la liaison entre les Pi les plus éloignés, libérant l'énergie contenue dans la liaison. L'ATP est ainsi transformée en ADP (adénosine diphosphate) + Pi + Energie (environ 30,5 kJ). L'ajout d'un Pi à l'ADP grâce à de l'énergie provenant de la dégradation des substrats énergétiques entraine la resynthèse de l'ATP. Le métabolisme anaérobie renvoie aux processus aboutissant à la resynthèse de l'ATP sans requérir l'intervention de l'oxygène. En revanche, le métabolisme oxydatif, comme son nom l'indique, nécessite de l'oxygène.

La resynthèse de l'ATP peut donc s'effectuer par plusieurs voies métaboliques : la filière anaérobie alactique correspondant à la voie des phosphagènes, la filière anaérobie lactique correspondant au système glycolytique et la filière aérobie correspondant au système oxydatif.

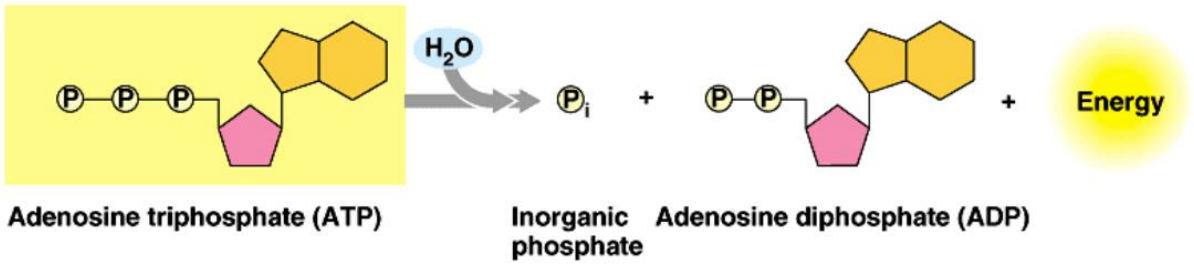


Figure 16 : Hydrolyse de l'ATP (Campbell et al., 2009).

a) Filière anaérobie alactique

La filière anaérobie alactique correspond au système énergétique utilisé sans oxygène et ne produisant pas d'acide lactique, dont la capacité à resynthétiser de l'ATP est limitée par son faible stock de substrats. Il existe deux voies métaboliques permettant la resynthèse rapide d'ATP :

- Une première basée sur l'utilisation de la phosphocréatine (PCr), un composé phosphoré. L'enzyme créatine kinase (CK) rompt la liaison phosphate de la PCr et permet de séparer la créatine du Pi, et d'en récupérer l'énergie contenue dans la liaison, alors transféré sur l'ADP avec un Pi pour former l'ATP selon l'équation ci-dessous :

$PCr + ADP + H^+ \rightleftharpoons Créatine + ATP$

Cette réaction est réversible et permet aussi de reconstituer les stocks de PCr. Les stocks de PCr sont assez faibles (n'excédant pas 20 mmol.kg-^{1} de muscle frais) et ne permettent la réalisation d'un effort que de 5 à 10 secondes à une très haute intensité (effort maximal et intense à FC quasi-maximale).

- L'autre voie qui consiste à transférer un Pi d'une molécule d'ADP à une autre. Cette réaction est catalysée par l'enzyme myokinase (MK) et donne une molécule d'adénosine monophosphate (AMP) et un ATP : $ADP + ADP \rightleftharpoons ATP + AMP$.
  Ce système intervient surtout en relais lorsque les réserves de PCr sont épuisées.

b) Filière anaérobie lactique

La filière anaérobie lactique est un système énergétique plus complexe, d'une mise en route assez rapide, qui ne fournit pas de grandes quantités d'ATP non plus. Ainsi, l'association des deux filières anaérobies alactiques et lactiques permettre une fourniture d'énergie pendant les deux premières minutes d'un exercice.

- Glycogénolyse : voie métabolique qui permet de dégrader le glycogène. Celui-ci est mis en réserve dans le muscle (et le foie) sous forme de polymère du glucose (n-unités glycosyls) et permet d'alimenter la glycolyse musculaire (ou de réguler la glycémie pour ce qui concerne le glycogène hépatique).

- Glycolyse : voie métabolique subséquente ou secondaire à la glycogénolyse, c'est la voie qui fournit l'ATP de la filière anaérobie lactique. La glycolyse est la dégradation du glucose par le biais de 10 réactions enzymatiques successives se déroulant dans le cytoplasme des cellules. Parmi ces réactions, l'énolase (ENO) catalyse la transformation du 2-phosphoglycérate en phosphoénolpyruvate, la lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la transformation réversible du pyruvate en lactate en présence de NAD^+/NADH. Nous n'expliquerons pas en détails mais les réactions apparaissent sur la Figure 17.

Lors d'un exercice à haute intensité, la grande partie de l'énergie est issue des glucides provenant du glucose stocké en réalité sous forme de glycogène intramusculaire alors qu'une plus petite partie provient directement du glucose plasmatique. Dans le muscle humain, on retrouve principalement l'isoforme 4 des transporteurs du glucose permettant le passage du glucose plasmatique à la cellule musculaire (GLUT4).

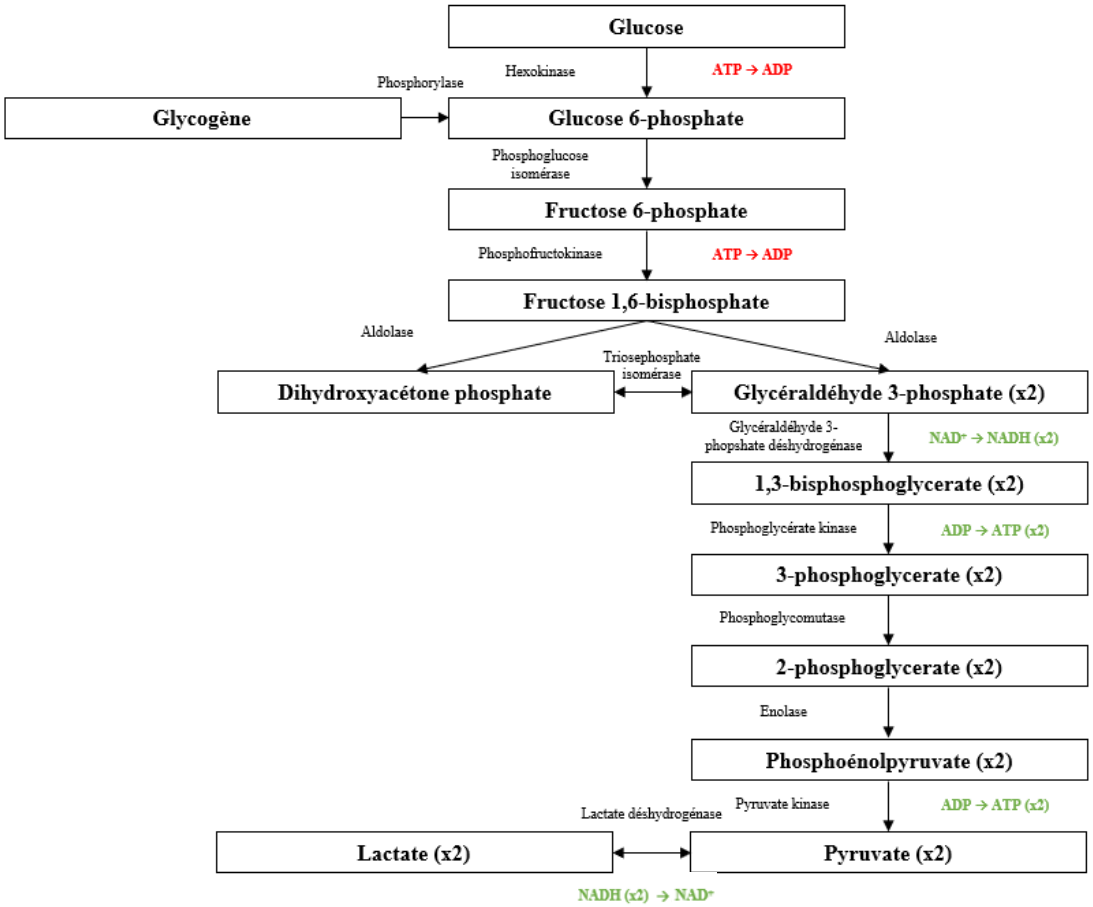


Figure 17 : Les 10 réactions enzymatiques de la voie anaérobie lactique de la glycogénolyse et de la glycolyse.

c) La voie aérobie

La filière aérobie est une succession de processus encore plus complexes qui fait appel au métabolisme oxydatif, nécessitant donc l'intervention de l'O_2. Contrairement aux filières anaérobie alactiques et anaérobie lactiques, son rendement énergétique est très élevé mais sa production d'ATP est nettement plus lente. Les actions combinées de ces 3 filières permettent une fourniture d'énergie sur plusieurs heures.

La glycolyse aérobie génère du pyruvate qui peut rentrer dans une voie métabolique lorsqu'il est en présence d'oxygène. Ainsi, le pyruvate permet de poursuivre sa dégradation et la fourniture d'ATP à l'intérieur de la mitochondrie. Avant d'entrer dans le cycle de Krebs, le pyruvate est d'abord décarboxylé en un fragment à 2 carbones par l'intermédiaire d'une série d'enzymes (complexe pyruvate déshydrogénase) liée au coenzyme A (CoA) pour former l'acétyl-CoA. Cette réaction permet la réduction d'un NAD^+ en NADH+ H^+.

Par la suite, l'acétyl-CoA rentre dans le cycle de Krebs (Figure 18). La première étape du cycle de Krebs consiste en la formation du citrate à partir de l'acétyl-CoA, de l'oxaloacétate et libération du CoA sous l'action de l'enzyme citrate synthase (CS). Une série de réactions de déshydratation et de décarboxylation aboutissent à la production de 3 NADH+ H^+, 1 flavine adénine dinucléotide réduite ($FADH_2$), 1 ATP et du CO_2. Le cycle revient enfin à son point de départ, l'oxaloacétate, où ce dernier pourra se combiner avec un autre acétyl-CoA pour un cycle suivant. C'est la présence d'oxygène qui va permettre à la chaîne respiratoire présente dans la membrane interne des mitochondries d'oxyder les NADH+ H^+ et le $FADH_2$ produits en amont.

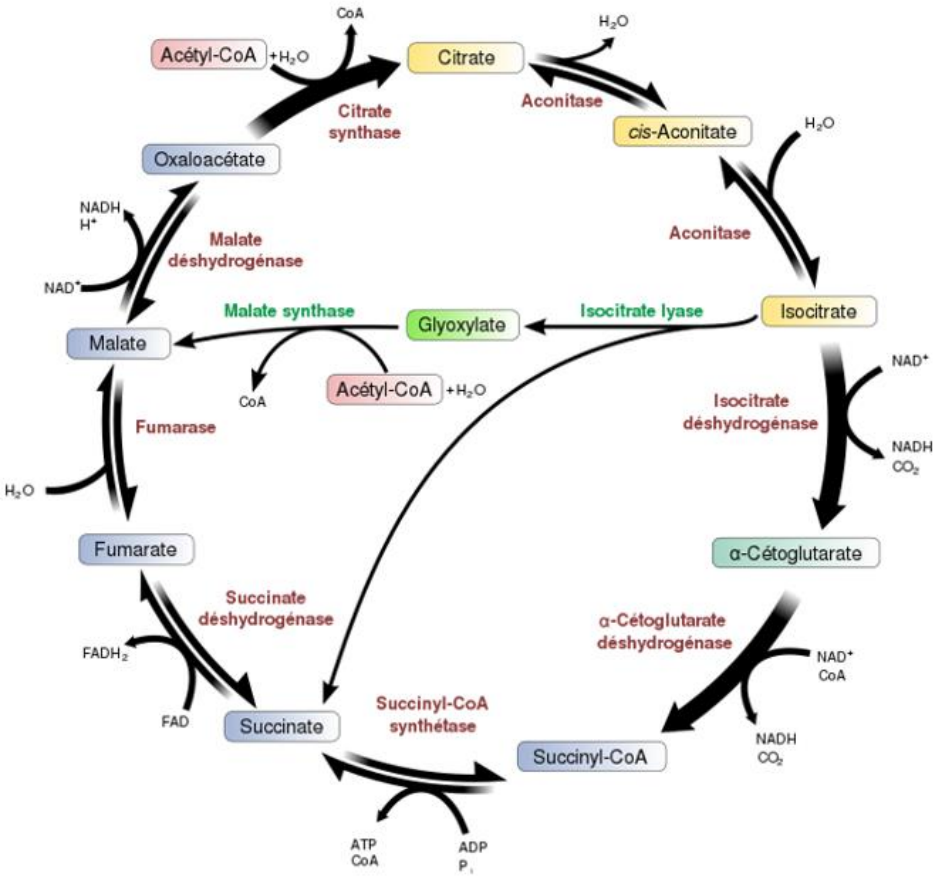


Figure 18 : Les 10 étapes du cycle de Krebs.

Les lipides, essentiellement les triglycérides, sont présents en grand nombre dans l'organisme et constituent également un substrat de la filière aérobie. La dégradation permet de resynthétiser l'ATP. Les acides gras issus de la lipolyse sont ensuite métabolisés principalement par le biais de 2 voies : la β-oxydation et la cétogenèse. La β-oxydation intervient lors d'un exercice physique prolongé tandis que la voie de la cétogenèse intervient principalement en période de jeûne prolongé ou de diabète. La β-oxydation, appelée aussi spirale de Lynen, est responsable de la production d'acétyl-CoA et de la production de coenzymes réduits ($FADH_2$ et $NADH+ H^+$) (Figure 19). La formation d'ATP par la β-oxydation des acides gras nécessite un certain délai et une intensité d'exercice nettement sous-maximale mais sa réserve d'énergie est très importante.

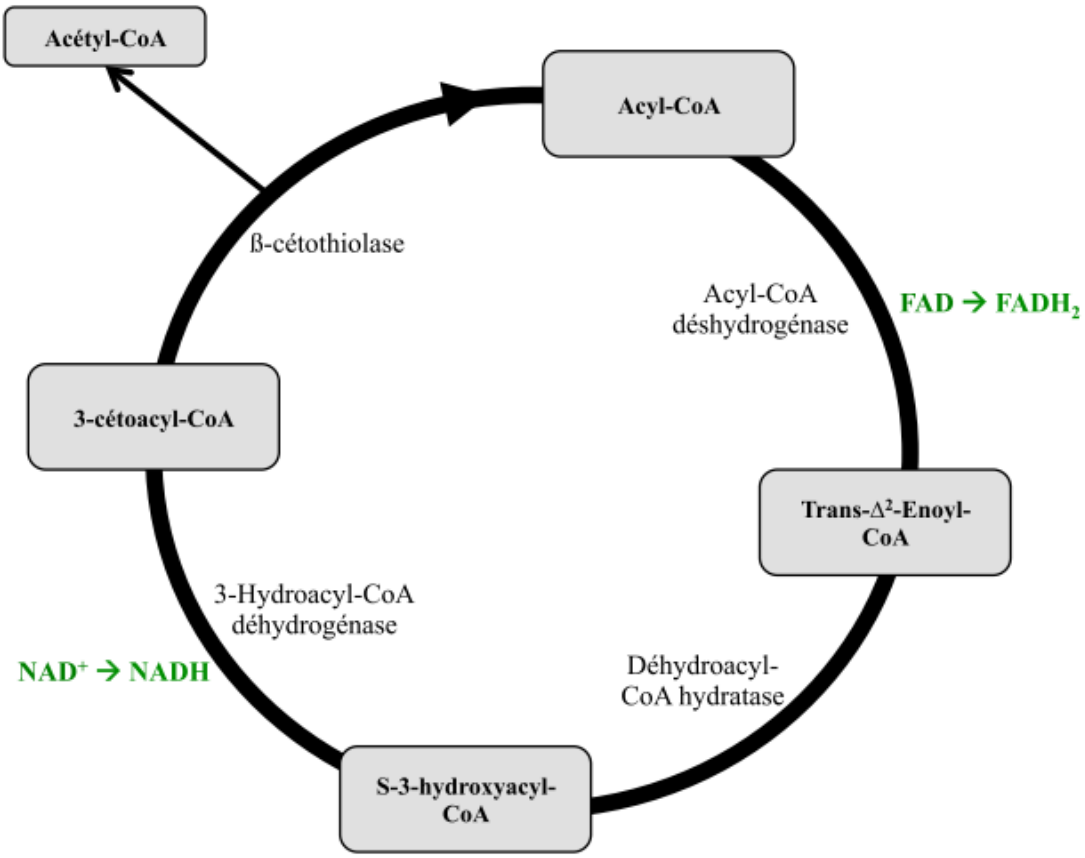


Figure 19 : Schéma de la β-oxydation. Schéma extrait de la thèse de Chatel (2017).

La chaine respiratoire est une chaine de transport des électrons réalisant l'oxydation des co-enzymes réduits (NADH+ H^+ et $FADH_2$) produits dans le cytoplasme (lors de la glycolyse) ou dans la matrice mitochondriale (lors de la β-oxydation et du cycle de Krebs) afin de re-synthétiser de l'ATP (Figure 20). Cette chaine respiratoire est localisée sur la membrane interne de la mitochondrie et est constituée d'enzymes membranaires, et d'une succession de complexes protéiques transporteurs d'électrons. Elle récupère et transporte les électrons issus de l'oxydation du NADH+ H^+ et du $FADH_2$ tout le long de la chaîne respiratoire L'oxydation du NADH+ H^+ en NAD^+ est réalisée au niveau du complexe I, celle du $FADH_2$ en FAD est réalisée au niveau du complexe II. Les électrons récupérés à l'issue de ces 2 entrées par CI et CII sont ensuite transférés au complexe III puis au complexe IV par l'intermédiaire du cytochrome c (Cox).

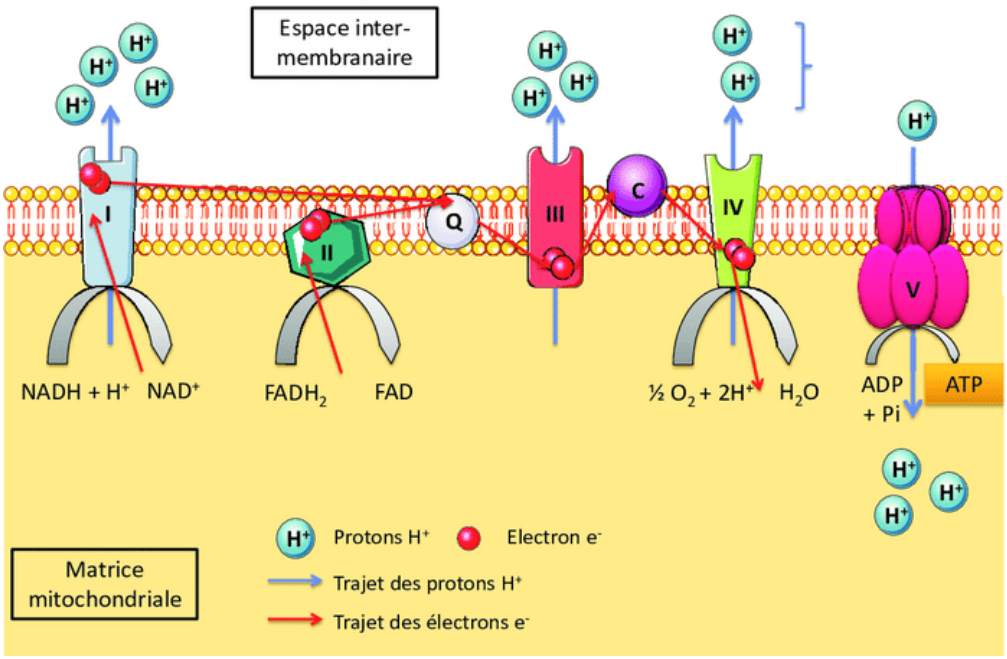


Figure 20 : Schéma de la chaine respiratoire.

Les H^+ expulsés hors de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire au niveau du CI, CIII et CIV vont créer de part et d'autre de la membrane un gradient de concentration en H^+ et un gradient électrochimique à travers la membrane interne de al mitochondrie, la face matricielle devenant négative et l'espace intermembranaire positif. Ce gradient électrochimique emmagasine de l'énergie. Libérée au niveau du complexe V, cette énergie permet la phosphorylation de l'ADP en ATP par l'enzyme ATPase.

Pour conclure, les 3 filières énergétiques ne fonctionnent pas de manière isolée et indépendante mais au contraire, pour tout type d'exercice, elles interviennent simultanément mais dans des proportions différentes. En réalité, leurs interventions dépendent de leurs quantités d'ATP produites. La filière aérobie possède le rendement le plus élevé. La dégradation d'une molécule de glucose permet la production nette de 38 ATP et de 39 ATP pour une molécule de G-6-P (issue de la glycogénolyse) mais ce rendement est théorique, en réalité il dépend de nombreux facteurs tel que le potentiel de la membrane mitochondrial. Pour les lipides, le bilan énergétique est de 129 ATP par molécule de palmitate oxydé. La filière anaérobie alactique a un rendement net de seulement 2 ATP (produits à partir d'une molécule de glucose).

d) Utilisation des substrats à l'exercice

La mobilisation des substrats chez un individu donné à tout point de l'exercice dépend du cross-over (interaction) entre les réponses métaboliques induites par l'intensité de l'exercice (sollicite l'utilisation des glucides) et les réponses induites par l'entraînement qui favorisent l'utilisation des lipides (Brooks & Mercier, 1994). Cette théorie glucido-lipidique doit prendre en considération les protéines, non négligeables et impactantes dans la réalité physiologique. Ainsi, l'organisme doit être capable d'utiliser dans une plus grande mesure un nutriment, au détriment d'un autre, comme source d'énergie. C'est la flexibilité métabolique.

Lors d'un effort d'intensité faible à modérée (fréquence cardiaque proche de celle du repos à 65 % de la FC maximale), les principales sources d'énergie sont le glucose et les acides gras, libérés par la lipolyse, et cette utilisation des substrats est influencé par l'intensité, la durée et le mode d'exercice, les facteurs externes tels que les conditions environnementales, l'âge ou encore la composition corporelle (Egan & Zierath, 2013). Les taux d'oxydation des glucides (CHOox) et des graisses (Lipidox) sont évalués grâce aux équations suivantes proposées par Frayn (Frayn, 1983) :

$$\text{CHOox } (g \cdot min^{-1}) = 4.55 \cdot \dot{V}CO_2 - 3.21 \cdot \dot{V}O_2 - 2.87 \cdot 0.01$$

$$\text{Lipidox } (g \cdot min^{-1}) = 1.67 \cdot \dot{V}O_2 - 1.67 \cdot \dot{V}CO_2 - 1.92 \cdot 0.01$$

La répartition des substrats se calcule à l'aide des équations proposées par Zarins et al. (2009) (Zarins et al., 2009) : *Le quotient respiratoire non protéique (NPQR) reflètent les macronutriments qui sont métabolisés.*

NPRQ (%) = [$\dot{V}CO_2$ – (0.01 · 4.89)] / [$\dot{V}O_2$ – (0.01 · 6.04)]

%CHOox (%) = [(NPRQ – 0.707) / 0.293] · 100

%Lipidox (%) = (100 - %CHOox)

II. Régulation du pH dans le muscle squelettique

1) *Le devenir de l'acide lactique*

Considéré encore comme le principal facteur limitant de la filière anaérobie lactique, bien que discuté, l'acidose associée à l'accumulation du lactate dans les cellules musculaires survient lors d'un exercice court et très intense (jusqu'à 2 minutes). La concentration musculaire du lactate peut passer de 1 à 25 mmol/kg de muscle frais et cette forte accumulation de lactate est accompagnée d'une baisse du pH musculaire (Messonnier et al., 2007). Cette même association/ concomitance est retrouvée au niveau sanguin (Hermansen & Osnes, 1972; Sahlin et al., 1976).

Pour expliquer ce lien étroit entre acidose et accumulation de lactate, certains attribuent la dissociation de l'acide lactique comme cause de l'acidose (Böning & Strobel, 2005; Marcinek et al., 2010). D'autres soutiennent que si l'acide lactique est produit par la glycolyse, cette production est proportionnelle au turnover de l'ATP dont l'hydrolyse produit des ions H^+ alors source de l'acidose (Robergs et al., 2005).

Enfin, une troisième école fait référence au concept de « Strong Ion Différence » (SID). Le mécanisme invoqué est la préservation de l'électroneutralité de l'organisme. Ainsi, l'ajout des ions positifs et négatifs de l'organisme doit être égal à 0. Selon ce concept, la production d'un ion négatif aussi fort que le lactate doit obligatoirement s'accompagner de la production d'un ion positif. Dans ce cas, c'est le proton (ion H^+) qui est la variable d'ajustement et sa production augmente au fur et à mesure que l'ion lactate augmente (Robergs et al., 2005) et ce concept s'applique aussi bien au niveau musculaire que sanguin (Lindinger et al., 2005).

En revanche, tous les auteurs s'accordent à dire que toute accumulation de lactate s'accompagne d'une accumulation d'ions H^+ et donc d'une acidose. Différents mécanismes régulent le métabolisme énergétique et l'homéostasie systémique. Certains impliqués dans la régulation du pH du muscle squelettique strié, et responsables de l'élimination intramusculaire des ions H^+, développés ci-dessous.

2) Mécanismes tampons intracellulaires

Ces mécanismes tampons peuvent être classés en trois grandes catégories : les mécanismes dits intrinsèques (dépendant du phosphate inorganique (Pi), des protéines et le dipeptide contenant de l'histidine et la carnosine (Parkhouse & McKenzie, 1984), les mécanismes dépendant des bicarbonates et les mécanismes de transport.

a) Le dipeptide et ses composés

Le dipeptide contient de l'histidine et de la carnosine (Parkhouse & McKenzie, 1984). Les protéines et les composés apparentés à l'histidine ne représentent que 20 à 40 % de la capacité tampon intramusculaire totale chez l'homme, et cette valeur dépendra de leur concentration réelle dans le muscle (Abe, 2000; Thomas et al., 2007).

En particulier, les dipeptides carnosine et ansérine sont présents dans des proportions et des quantités variables dans le muscle squelettique et diverses fonctions physiologiques leur sont attribuées, notamment l'amélioration de la sensibilité au calcium de protéines contractiles (Lamont & Miller, 1992). Ce rôle de tampon physico-chimique a évidemment une implication dans le maintien de l'équilibre acido-basique, notamment lors d'exercices de haute intensité ou en condition hypoxique, lorsque de grandes quantités d'ions hydrogène sont produites en association avec le lactate. La carnosine est plus présente dans les muscles à fibres de type rapide que dans les muscles à fibres de type lentes (Mannion et al., 1995).

b) Mécanismes dépendants du bicarbonate et anhydrases carboniques (CAII et CAIII)

Dans ce mécanisme, les protons produits sont tamponnés par les ions bicarbonate. Ces ions bicarbonate sont convertis en eau et en CO_2 et s'ajouteront au CO_2 de la respiration. L'anhydrase carbonique (CA) est une enzyme omniprésente qui catalyse l'équilibrage du dioxyde de

carbone, des protons et du bicarbonate ($H^+ + HCO3^- \rightleftharpoons H_2O + CO_2$). Le muscle squelettique contient des isozymes d'anhydrase carbonique qui accélèrent l'élimination du proton sous forme de CO_2. Ces Isoenzymes sont les CA II et CA III. Par ailleurs, il a été montré que CAII améliore l'activité de transport du lactate via MCT1 et MCT4 (Klier et al., 2011), il améliore l'activité des transporteurs acide/base tels que le co-transporteur de bicarbonate de sodium (NBC) et l'échangeur sodium/hydrogène (NHE1) (Becker & Deitmer, 2008).

En revanche, lors d'une activité physique, une étude chez l'homme a mis en évidence des corrélations positives entre le contenu cytosolique en CAII et CAIII et la diminution du pH musculaire, et l'accumulation de lactate (Messonnier et al., 2007). Ainsi, il est concevable que le système tampon de bicarbonate puisse être un mécanisme tampon important dans la cellule (Beaver et al., 1985) et que son efficacité puisse avoir des implications importantes sur la capacité de travail lors d'exercices de haute intensité.

3) Mécanismes de transport

Une des catégories de mécanismes impliqués dans l'élimination intramusculaire de H^+ est constituée par l'évacuation du H^+ du myocyte, impliquant les mécanismes de transport du proton à travers le sarcolemme, dans un sens comme dans l'autre.

a) Transporteur aux monocarboxylates (MCTs)

14 membres composent la famille des transporteurs aux monocarboxylates (MCTs) mais seuls les quatre premiers (1-4) ont un rôle dans le transport des protons, des corps lactate, pyruvate et cétonique (Halestrap, 2013b). Cela signifie que ces isoformes assurent le symport d'un monocarboxylate et d'un proton dans la même direction avec un ratio de 1 : 1. Au niveau du muscle strié squelettique, seuls MCT1 (SLC16A1), MCT2 et MCT4 ont été retrouvés.

Si MCT2 a régulièrement été décrit chez l'animal, notamment chez la souris, sa présence dans le muscle humain est plus débattue. La difficulté d'obtenir des anticorps fiables et très spécifiques est peut-être la réponse à ces divergences.

Ces isoformes présentent une distribution particulière au niveau des différents types de fibres et des propriétés spécifiques, avec notamment différentes vitesses maximales et

constantes d'affinités (Halestrap, 2012, 2013a; Hashimoto et al., 2005; Juel, 1998). L'isoforme MCT1 se trouve principalement dans les fibres oxydantes. En effet, une étude réalisée sur le muscle squelettique du rat (McCullagh et al., 1996) a révélé une teneur relative en MCT1 plus faible dans les muscles composés de fibres glycolytiques (type IIb) que dans les muscles ne comportant que des fibres oxydantes (type I ⩽ IIa).

Le rôle physiologique majeur de MCT1 est de faciliter l'entrée ou la sortie de l'acide L-lactique dans ou hors des cellules en fonction de leur état métabolique. MCT1 catalyse soit le transport net d'un monocarboxylate avec un proton, soit l'échange d'un carboxylate contre un autre. Cependant, chez certaines espèces, le MCT2 d'affinité plus élevée (SLC16A7) peut remplir ce rôle (Halestrap & Wilson, 2012). Le transport du lactate médié par MCT1 est facilité par l'activité du NBC (co-transporteur Na^+/bicarbonate, ou SLC4A4) (Becker et al., 2004) et la présence d'anhydrase carbonique extracellulaire (isoformes d'anhydrase carbonique IV et XIV) facilite le transport lactate /H^+.

Des études utilisant le Northern Blot, l'analyse Western Blot et la microscopie d'immunofluorescence ont démontré que MCT2 est faiblement exprimé dans les principaux tissus humains contrairement à la souris, le rat et le hamster (Halestrap & Price, 1999). Cependant, MCT2 partage 60 % d'identité avec MCT1, mais il a une plus grande affinité pour le pyruvate et le lactate que MCT1. Son expression est principalement confinée aux tissus qui absorbent l'acide lactique en quantités importantes. L'activité de transport de MCT2 est renforcée par l'anhydrase carbonique IV extracellulaire (CAIV) mais pas par l'anhydrase carbonique intracellulaire II (CAII) (Klier et al., 2011).

L'isoforme MCT4 (SLC16A4) est présente dans toutes les fibres, et est largement exprimée tant au niveau de l'ARNm que des protéines, et particulièrement fortement dans les tissus glycolytiques (fibres blanches des muscles squelettiques, astrocytes, globules blancs et chondrocytes). Le MCT4 est principalement impliqué dans l'efflux de lactate à partir des fibres glycolytiques (Halestrap & Wilson, 2012; McCullagh et al., 1996). Cependant, MCT4 a une affinité beaucoup plus élevée pour le lactate que pour le pyruvate, mais moins importante que MCT1. Ainsi, MCT4 a un taux d'efflux de fibres limité, provoquant une accumulation d'acide lactique avec une baisse conséquente du pH intracellulaire (Halestrap, 2013a). Étant donné que MCT1 et MCT4 sont tous deux impliqués dans le cotransport du lactate et de H^+ dans le muscle squelettique, une étude de Messonnier et de ses collaborateurs a testé s'il existait une corrélation

entre leur contenu musculaire et les capacités d'échange de lactate (γ1) et d'élimination (γ2) de lactate pendant la récupération après un court exercice supra maximal complet (Messonnier et al., 2007). Aucune corrélation n'a été trouvée. Ces résultats suggèrent que plutôt que le contenu musculaire des MCT, ce serait l'environnement, déterminant la fonctionnalité des transporteurs, qui aurait un rôle majeur dans l'échange de lactate (Maciejewski et al., 2016).

b) L''échangeur Na^+/H^+ (NHE1, ou SLC9A1)

NHE1 dans le muscle est le système de transport régulateur de pH classique présent, le plus abondant dans les fibres glycolytiques. L'échangeur fonctionne comme un antiport en échangeant un ion H^+ contre un ion Na^+ (Juel, 1998, 2008). Il est considéré que l'échangeur NA^+/H^+ joue un rôle important dans la régulation du pH au repos, il a eu très peu ou pas d'effet sur le pHi pendant la fatigue alors que les MCT sont impliqués lors d'exercices de haute intensité (Juel, 2000). Cependant, ce positionnement et/ou son importance pourrait être revus/rediscutés à l'aune des résultats obtenus plus récemment par Chatel et al. (2017).

c) Co-transporteur sodium/bicarbonate (NBC ou SLC4A4)

NBC a été identifié dans différentes cellules, et ce n'est qu'assez récemment qu'il a été identifié dans le muscle squelettique humain. Le muscle squelettique humain possède deux variantes des isoformes du co-transporteur sodium/bicarbonate : NBCe1 et NBCe2, mais on ne sait pas comment elles sont régulées (Kristensen et al., 2004). Les NBC identifiés dans le muscle squelettique sont tous deux supposés être électrogéniques, probablement avec un rapport HCO3- : Na^+ de 2 : 1 ou 3 : 1 (Soleimani & Burnham, 2001; Virkki et al., 2002) et transportant donc une charge nette négative.

Becker et al ont rapporté une augmentation de l'activité de transport du lactate lorsque MCT1 est exprimé avec NBC dans les ovocytes de xénope. C'est la dissipation du gradient de protons avec le transport du bicarbonate NBC qui facilite l'activité de transport de MCT1 (Becker et al., 2004). Ainsi, NBC et MCT1 coopèrent fonctionnellement. L'entraînement à haute intensité induit une augmentation de MCT1 accompagnée d'une augmentation de NBC, aidant ainsi à supprimer l'accumulation d'H^+ extracellulaire, et à maintenir le gradient de pH. Le transport du lactate est donc amélioré dans le muscle squelettique oxydatif lors d'exercices de haute intensité et pendant la récupération (Juel & Halestrap, 1999; Thomas et al., 2007).

4) *Mécanismes tampons extracellulaires (CAIV et CAXIV)*

L'anhydrase carbonique 4 (CAIV) et l'anhydrase carbonique 14 (CAXIV) sont deux isoformes de CA fixées sur la membrane musculaire avec leurs centres actifs orientés vers l'espace extracellulaire. Conceptuellement parlant il est concevable qu'en consommant le H^+ quittant la cellule, une activité CAIV et CAXIV élevée puisse favoriser un large gradient de protons intra- à extracellulaire et donc l'export du lactate et du H^+ à travers le sarcolemme.

Un tel export pourrait favoriser la régulation du pH musculaire et la fonction musculaire, L'étude de Messonnier et collaborateurs chez l'homme tant à soutenir cette hypothèse (Messonnier et al., 2007). A la suite d'un exercice supra maximal court, une corrélation positive entre le contenu sarcolemmal de CAIV et le travail total effectué a été relevée. Dans une autre étude menée par Bishop et ses collaborateurs, l'abondance moyenne de CAXIV s'est avérée augmentée après 4 semaines d'entraînement HIIT (High Intensity Interval Training) tandis que CAIV n'a pas changé. Ceci suggère qu'il pourrait y avoir une amélioration du transport acido-basique et du buffering intra- et extra-cellulaire grâce à l'entraînement, mais cette étude a été réalisée in vivo, dans un modèle animal (McGinley & Bishop, 2016). Enfin, il a également été montré que l'activité de transport de MCT2 est augmentée par la co-expression avec CAIV (Klier et al., 2011). A ce jour, aucune étude n'a rapporté de différences entre les hommes et les femmes sur les mécanismes impliqués dans la régulation du pH musculaire.

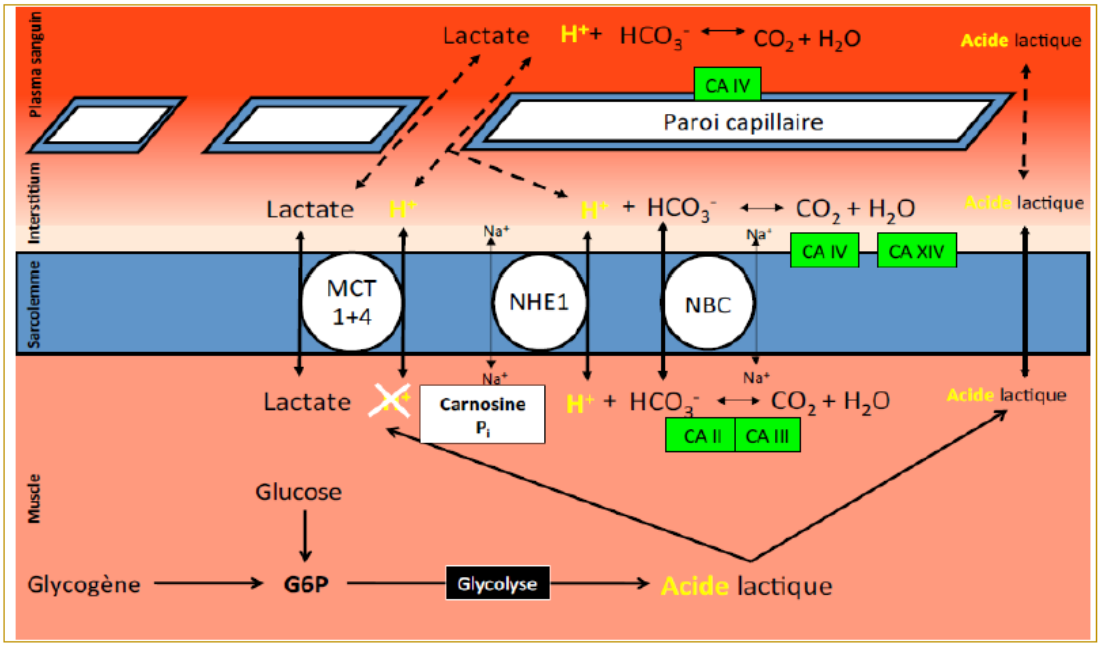


Figure 21 : Schéma des différents éléments impliqués dans la régulation du pH musculaire.

III. Répercussions de la drépanocytose sur le muscle strié squelettique

1) Remodelage microvasculaire

Ravelojaona et al. (Ravelojaona et al., 2015) ont mis en évidence un profond remodelage du tissu musculaire et en particulier de son réseau microvasculaire chez les patients drépanocytaires n'ayant reçu aucun traitement (et dans une moindre mesure chez des sujets porteurs du trait drépanocytaires). Ce remodelage microvasculaire est caractérisé par une raréfaction du réseau capillaire, une diminution de la tortuosité des micro vaisseaux, un élargissement du diamètre des micro vaisseaux et une fragilisation des capillaires. Ceci pourrait relever d'une adaptation permettant de maintenir la surface d'échange théorique dans le muscle, et donc un maintien du débit sanguin local, en limitant l'enclavement des hématies dans la microvascularisation, et permettant de moins laisser la place aux crises vaso-occlusives.

a) Raréfaction du réseau capillaire

L'indice CAF (nombre de capillaires en contact avec une fibre musculaire) et la densité capillaire sont diminués chez les patients SCD, témoignant d'une raréfaction du réseau microvasculaire du muscle strié squelettique (Ravelojaona et al., 2015) (Figure 22). Ainsi, malgré une densité capillaire plus faible, l'apport sanguin musculaire pourrait ne pas être altéré dans l'anémie falciforme, ce qui suggère que l'apport d'oxygène inférieur aux tissus rapporté chez les patients SCD (Nahavandi et al., 2004; Waltz et al., 2012) pourrait être attribué à l'anémie et à la désaturation artérielle en oxygène (Quinn & Sargent, 2007) plutôt qu'à une insuffisance de l'approvisionnement en sang local.

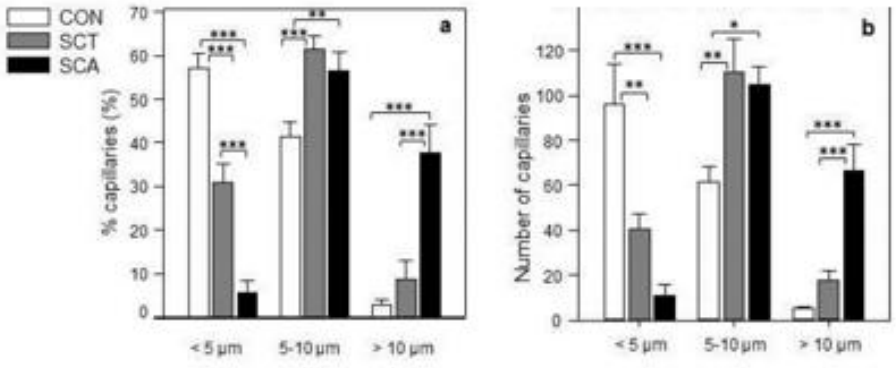


Figure 22 : Capillary Outer Diameter (COD, µm).

(a) Pourcentage de capillaires avec COD <5µm, 5-10µm et >10µm. (b) Nombre de capillaires avec COD <5µm, 5-10µm et >10µm. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (Ravelojaona et al., 2015).

b) Moindre tortuosité des micro vaisseaux

Chez les patients SCD, les différentes perturbations de la circulation sanguine locale peuvent être atténuées par la moindre tortuosité capillaire observée. Pour expliquer ces différentes adaptations, une étude a observé le réseau microvasculaire dans le muscle squelettique des patients SCD. Les résultats ont montré une réduction du pourcentage et du nombre de micro-vaisseaux de petits diamètres (< 5 µm) alors qu'on observe une augmentation du nombre de micro-vaisseaux de plus grands diamètres (< 10 µm) (Ravelojaona et al., 2015). Cette observation suggère donc une régression des plus petits micro-vaisseaux et un maintien du nombre des plus grands.

Ravelojaona et collaborateurs (Ravelojaona et al., 2015) ont remarqué l'absence de cellules musculaires lisses et de tissu fibreux et/ou collagénique dans et autour de la paroi capillaire ce qui permet d'exclure l'hypothèse que les gros/larges micro vaisseaux observés puissent être des artérioles ou des veinules. Ils s'avéreraient que ce soient plutôt des capillaires distendus. Enfin, la proportion et le taux d'HbS circulant joue un rôle important sur ce remodelage microvasculaire. En effet, Vincent et collaborateurs (Vincent et al., 2010) ont observé que les caractéristiques microvasculaires chez les sujets SCT (porteurs du trait drépanocytaire) étaient intermédiaires entre les sujets contrôles (CON) et les patients SCD. Résultats confirmés ultérieurement par Ravelojaona et al. 2015 (Ravelojaona et al., 2015).

2) Remodelage structural

Les patients SCD montrent une hypotrophie musculaire, manifestée par une réduction d'environ 30% de la surface des fibres de type I et IIa et une réduction d'environ 38% de la surface occupée par 100 myocytes (Ravelojaona et al., 2015). Par ailleurs, les patients SCD affichent une augmentation des fibres de type I suggérant une disparition des fibres de type IIa et un maintien relatif des fibres de type I. Puisque les patients SCD ont une activité physique et journalière très restreinte, ils ont une faible demande énergétique (Buchowski et al., 2002). Ainsi, le besoin de recrutement des fibres rapides de types IIa est plus limité tandis que les fibres de type I resteraient impliquées au quotidien.

Les CVO et les différents épisodes d'ischémie-reperfusion que subissent les patients drépanocytaires pourraient conduire à l'amyotrophie observée (Eltzschig & Eckle, 2011; Wallace et al., 2009). D'autres signes témoignent également d'un remodelage musculaire chez les patients drépanocytaires avec une augmentation de nombre de cellules satellites en proportion du taux d'HbS et par conséquent une prolifération de ces cellules suggérant une activation du processus régénératif (Kadi et al., 2004) chez les patients. Si l'amyotrophie observée chez les patients SCD peut être en partie liée à leur faible activité physique (Buchowski et al., 2002) un défaut dans le processus de régénération ne peut être totalement exclu. L'intensité modérée de ce remodelage musculaire est comparable aux manifestations histologiques observées chez les patients souffrant de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO).

3) Remodelage énergétique

Dans l'étude de Ravelojaona, l'analyse des enzymes clés du métabolisme énergétique a révélé une diminution des activités β-HAD (enzyme oxydative, β-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase) et CS (enzyme oxydative, Citrate Synthase) chez les patients SCD (Ravelojaona et al., 2015) (Figure 24). Ces deux enzymes sont respectivement des marqueurs représentatifs de l'oxydation des acides gras et du cycle de Krebs. De ce fait, la diminution de ces deux activités enzymatiques témoigne d'une altération des capacités oxydatives du muscle squelettique chez les patients SCD. Dans cette même étude, la diminution de l'activité COx sur les fibres de type IIa et IIx, observée par une analyse histoenzymologique, a confirmé cette altération des processus oxydatifs. En revanche, l'activité COx apparaît maintenue sur les fibres de type I et soutient l'hypothèse selon laquelle dans la drépanocytose, les fibres de type I sont moins affectées que les autres types de fibres en raison d'une sollicitation à minima.

L'activité de la Créatine Kinase (CK) est également altérée (Ravelojaona et al., 2015) et d'autres études ayant observé cette même altération ont montré que les activités CK et COx peuvent être inhibées ou au moins atténuées par les ROS (Di Giovanni et al., 2001; Granata et al., 2009; Schwarze et al., 1998). En effet, un stress oxydant agissant sur le muscle des patients SCD pourrait être suspecté et a d'ailleurs déjà été observé sur le cerveau (Kato et al., 2009; Wood et al., 2005), le cœur, le poumon (Wood et al., 2008) et le rein (Nath et al., 2001). De plus, suite à l'augmentation de l'HbS contenant des GRs auto-oxydés, les patients SCD sont exposés à un stress oxydant important (Chaves et al., 2008).

Sign or activity	CON, $n = 10$	SCT, $n = 10$	SCA, $n = 7$
Enzyme activities			
CK[§]	1822 ± 36	1773 ± 50	1568 ± 90**[†]
PFK[§]	285.2 ± 9.6	306.0 ± 13.5	305.8 ± 11.3
LDH[§]	852.2 ± 41.5	897.5 ± 44.1	794.3 ± 40.3
CS[§]	20.7 ± 1.1	20.6 ± 0.8	14.2 ± 0.7***[†††]
β-HAD[§]	17.6 ± 1.0	15.0 ± 0.7*	12.3 ± 0.7***[†]
COX type I[§]	179 ± 3	183 ± 2	180 ± 4
COX type IIa[§]	156 ± 3	155 ± 4	145 ± 3*
COX type IIx[§]	134 ± 3	123 ± 5*	120 ± 3*

For enzyme activities, values are expressed for all activities as $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot g^{-1}$ dry muscle except for COX activity, which is expressed in arbitrary units.
*$P < 0.05$, **$P < 0.01$, and ***$P < 0.001$ versus CON.
[†]$P < 0.05$, [††]$P < 0.01$, and [†††]$P < 0.001$ versus SCT.
[‡]Values are percentage of subjects showing histologic signs (number of subjects).
[§]Values are expressed as means ± SEM.
β-HAD, β-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; CK, creatine kinase; CON, healthy control; COX, cytochrome *c* oxidase; CS, citrate synthase; LDH, lactate dehydrogenase; MHC-I, major histocompatibility complex I; PFK, phosphofructokinase; SCA, sickle cell anemia; SCT, sickle cell trait.

Figure 23 : Caractéristiques énergétiques musculaires. D'après Ravelojaona et al, 2015.

Chapitre 4 : Effet de l'entraînement sur le remodelage musculaire, sur l'aptitude et qualité de vie des patients

Chez les sujets sains, l'entraînement en endurance est réputé pour ses bienfaits cardio-vasculaires. En effet, l'entraînement en endurance peut augmenter le débit cardiaque (DC) maximal, améliorer les propriétés rhéologiques des GRs et augmenter le flux sanguin musculaire (Morici et al., 2016). En revanche, chez les patients SCD, les médecins sont souvent réticents quant à l'idée de promouvoir une activité physique régulière car les changements métaboliques survenant pendant l'exercice physique peuvent favoriser la polymérisation de l'HbS, la falciformation des GRs, le stress oxydatif et l'inflammation, causant par la suite des CVO (Chirico et al., 2016; Connes et al., 2011; Martin et al., 2018). Pourtant, l'entraînement en endurance à intensité modérée (activité continue à 70 % de la $\dot{V}O_2$ max) apparaît désormais aussi comme une stratégie thérapeutique pour les patients SCD et nous allons tenter d'expliquer pourquoi dans ce chapitre n°4.

I. Aptitude et qualité de vie : quels impacts ?

La fonction musculaire altérée et observée chez les patients drépanocytaires peut être le résultat du remodelage microvasculaire, structurel et/ou énergétique musculaire. Le dysfonctionnement musculaire des patients drépanocytaires est préjudiciable à la capacité physique déjà affectée par l'anémie, les limitations cardiorespiratoires et les anomalies hématologiques, hémoglobiniques, hémorhéologiques et hémodynamiques. Le postulat pourrait être inversé et laisser à penser que, finalement, c'est cette absence d'activité physique qui aboutirait au remodelage.

1) Cercle vicieux et sédentarité

Outre la forme physique, les activités physiques de la vie quotidienne sont également affectées par le dysfonctionnement musculaire, ou peut-être que le dysfonctionnement musculaire est dû au manque d'activités des patients ? La dépense énergétique d'activité physique serait plus faible chez les patients drépanocytaires par rapport aux sujets témoins. De plus, les risques associés à une activité physique peuvent amener à décourager les enfants et les adultes atteints de drépanocytose de participer à des activités physiques. Ceux-ci adoptent des

modes de vie sédentaires qui aggrave davantage leur déconditionnement physique, et en particulier musculaire, et se retrouvent piégés dans un cercle vicieux qui entraîne une réduction de la fonction musculaire, de la forme physique et de la mobilité (Figure 24) (Merlet et al., 2019).

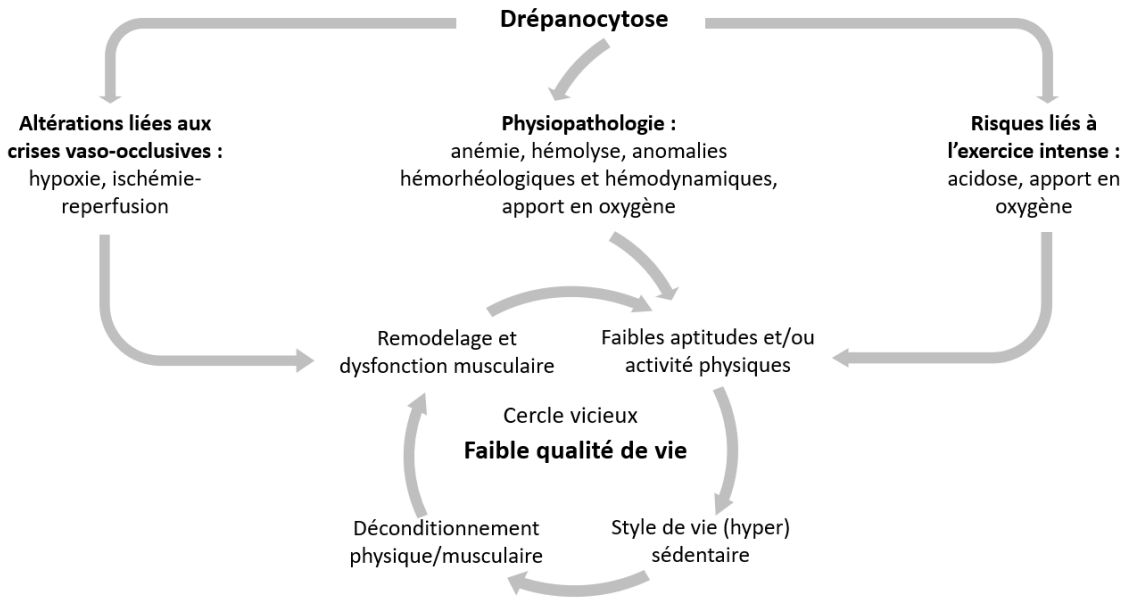


Figure 24 : Le cercle vicieux des répercussions de la SCD sur le muscle squelettique strié, conduisant à un profond remodelage et déconditionnement musculaire, et par conséquent à une mauvaise qualité de vie.

2) Complications pour des efforts du quotidien

Une fois que la mobilité est affectée par une force musculaire amoindrie et une capacité physique faible, les patients drépanocytaires ont des difficultés à gérer leur autonomie et à relever les défis physiques de la vie quotidienne. Ainsi, le premier seuil lactique (Waltz, Hedreville, et al., 2012) survenant au passage d'un exercice d'intensité modérée à intense est atteint à des intensités d'exercice très faibles, soit en moyenne 54 W et à une consommation d'oxygène de 0,4 à 0,8 $L \cdot min^{-1}$ (Anthi et al., 2007; Callahan et al., 2002). Ce seuil atteint pendant l'exercice est caractérisé par une consommation d'oxygène au-dessus de laquelle la production d'énergie aérobie est complétée par des mécanismes anaérobies, provoquant ainsi une augmentation soutenue du lactate et de l'acidose métabolique.

Compte tenu de la relation entre la consommation d'oxygène et la vitesse de marche (Browning et al., 2006), la marche peut devenir une tâche difficile pour les patients atteints de SCD lorsque la vitesse est supérieure à 3,0 à 4,5 $km \cdot h^{-1}$. Cette inférence illustre comment la mobilité peut être limitée chez les patients SCD. Il peut en outre être démontré que la capacité physique requise pour effectuer les activités clés de la vie quotidienne est proche du maximum des patients, comme cela a été montré précédemment chez les personnes âgées (Messonnier et al., 2019, 2021). Par exemple, dans le contexte du SCD, une étude a rapporté des valeurs moyennes de pic d'absorption d'oxygène très faibles à un effort maximal de 0,95 $L \cdot min^{-1}$ chez les femmes SCD (Callahan et al., 2002). Dans ce cas, marcher à 4,5 $km \cdot h^{-1}$ constituerait un effort quasi maximal pour ces femmes. Des conclusions similaires peuvent être tirées de l'étude d'Anthi et collaborateurs qui comprenait à la fois des hommes et des femmes (Anthi et al., 2007).

3) Impact sur les relations sociales

Dans diverses populations atteintes de maladies et de personnes âgées, de faibles niveaux de la condition physique et l'activité habituelle sont de bons prédicteurs de mauvaise qualité de vie (Davies et al., 1992) et de mortalité (Kodama et al., 2009). Cela s'applique très probablement également aux patients drépanocytaires qui présentent une plus grande fatigue associée à une qualité de vie inférieure (Ameringer et al., 2014). Les impacts sur la mobilité conduisent également à la dépendance, à la réduction des interactions sociales et, finalement, à la dépression. Les patients SCD augmentent notamment leur dépendance familiale et sociale, dégradant significativement leur qualité de vie.

II. Les risques liés à l'entraînement en endurance chez les patients SCD

L'exercice physique aigu et intense est connu pour induire un certain nombre de modifications telle que : une augmentation de la libération de l'oxygène par les GRs, des altérations hémorhéologiques, une augmentation de l'inflammation vasculaire, une activation endothéliale, un stress oxydatif, une accumulation de lactate et une acidose métabolique (Connes et al., 2013; Hermansen & Osnes, 1972; Lindinger et al., 2005). Fait est que le sujet sain tolère ces différentes altérations tandis que le patient drépanocytaire peut avoir des complications dangereuses. En effet, ce type d'effort est susceptible d'induire la polymérisation

de l'HbS et par conséquent favoriser la falciformation des GRs (Rees et al. 2010) et la survenue de crises vaso-occlusives (Connes et al., 2011). La déshydratation favoriserait l'apparition de drépanocytes (Clark et al., 1980) et l'augmentation de la température corporelle favorise la polymérisation de l'HbS (Hofrichter et al., 1974).

1) Acidose métabolique

Détaillé précédemment, l'exercice physique intense est associé à une acidose intramusculaire importante. Pour gérer l'accumulation de protons et les effets indésirables potentiels, plusieurs processus peuvent être activés (Juel, 2008).

a) Diminution du pH musculaire

Considérant qu'à l'effort, l'acidose intramusculaire est associée à une diminution significative du pH dans les compartiments veineux et artériel, une grande majorité des protons sont extrudés des myocytes vers le compartiment sanguin. Ainsi, plusieurs études menées chez des sujets sains ont illustré qu'en plus de l'acidose intramusculaire, l'exercice intense est associé à une diminution significative du pH sanguin veineux et artériel tant qu'une masse musculaire importante est impliquée (Hermansen & Osnes, 1972; Juel, 2008; Sahlin et al., 1978). La polymérisation de l'hémoglobine S et la falciformation érythrocytaire peut être déclenchée par une acidose pour des valeurs de pH comprises entre 7,4 et 7,2 (Greenberg et al., 1957; Ueda et al., 1979). Le pH diminue même lors d'un effort de faible intensité et son évaluation pendant l'exercice est complexe. Il peut cependant être contrôlé en mesurant la concentration de lactate dans le sang (Chatel et al., 2018) car le lactate est étroitement corrélé avec le pH (Hermansen & Osnes, 1972).

b) Accumulation de H^+ de grande ampleur

Dans la SCD, l'ampleur de l'accumulation de H^+ serait encore plus élevée par rapport aux sujets sains. Une étude récente menée dans un modèle murin SCD a indiqué une plus grande production intramusculaire de H^+ pendant l'exercice, même pour un exercice d'intensité faible à modérée, alors que la quantité de transporteurs de H^+ était inchangée (Chatel et al., 2017). En conséquence, des concentrations plus élevées de lactate dans le sang ont été rapportées chez les patients drépanocytaires après un exercice modéré par rapport aux sujets sains (Moheeb et al.,

2007) suggérant que la falciformation des GRs pourrait se produire pour des intensités d'exercice faibles. Par conséquent, une attention particulière doit être portée à l'équilibre acido-basique lors de l'exercice dans cette population.

2) Anomalies d'adaptations à l'effort

Plusieurs études rapportent des performances physiques moindres chez les patients SCD en comparaison à des sujets sains (Balayssac-Siransy et al., 2011; Millis et al., 1994; Moheeb et al., 2007). En effet, l'évaluation à l'exercice des patients SCD par un test incrémental sur ergocycle (la puissance augmentant toutes les 2 minutes) montre d'importantes limitations de leurs capacités respiratoires et cardiocirculatoires maximales (Callahan et al., 2002).

Aucune complication sévère n'a été rapportée lors de ce test mais tous les patients SCD présentaient des valeurs pics de consommation d'oxygène, de FC et de DC plus faibles que des sédentaires sains (Callahan et al., 2002). Ces différences s'expliquent par des anomalies d'adaptations respiratoires, cardiovasculaires et métaboliques en réponse à un niveau d'exercice donné : une dyspnée du moindre effort est observée, l'équivalent respiratoire du dioxyde de carbone est plus élevé, le ventricule gauche présente un trouble de la relaxation, la pression artérielle systolique est anormalement élevée, une hypoxémie artérielle est observée et le seuil ventilatoire est plus faible avec une mise en jeu plus précoce du métabolisme anaérobie lactique pour une charge de travail donnée (Waltz et al., 2012).

III. Les bienfaits de l'entraînement en endurance

L'entraînement en endurance générale consiste en un programme d'exercices structurés qui est soutenu pendant une durée, une intensité et une fréquence suffisantes dans le but principal d'augmenter la consommation maximale d'oxygène et de retarder l'apparition du second seuil lactique vers une intensité d'exercice plus élevée (Morici et al., 2016). Il existe plusieurs types d'endurance selon l'intensité et le la durée de l'effort. Il est question d'entraînement en endurance à intensité légère quand la FC est inférieure à 75% de la FC max et d'entraînement en endurance à intensité modérée quand la FC est de 75 à 85% de la FC max. Pour développer l'endurance maximale aérobie ou l'endurance critique, la FC est à 90 % de la FC max. Enfin, pour développer la puissance aérobie (PMA), il faut travailler à des intensités proches, égales ou supérieures à celle la sollicitant.

1) *Impact sur le système cardiaque*

Il a été démontré que l'exercice en endurance améliore la fonction cardiovasculaire chez les populations jeunes et âgées (Dehn & Bruce, 1972; Green & Crouse, 1993; Posner et al., 1986; Rerych et al., 1980). L'entraînement en endurance développe le muscle cardiaque. En effet, la taille du cœur augmente et ses contractions sont plus puissantes, diminuant ainsi la fréquence cardiaque au repos à 50 – 60 battements par minute, voire même en dessous de 40 battements par minute pour quelques cyclistes ou marathoniens de très haut niveau. A l'effort, le corps réagit en augmentant le débit cardiaque maximale et un de ses facteurs, le volume d'éjection systolique (Lind & McNicol, 1967).

Selon le principe de Fick (voir équation ci-dessous), cette amélioration permet déjà d'expliquer en grande partie l'augmentation de la consommation maximale d'oxygène ($\dot{V}O_{2max}$) : $\dot{V}O_2$ = (volume systolique · FC) · extraction.

Avec l'entraînement en endurance, les muscles se développent et de nombreux capillaires jusque-là inutilisés sont mobilisés pour améliorer les capacités d'irrigation sanguine. Les artérioles peuvent également se développer et se ramifier, et ce développement du réseau sanguin s'observe également dans les poumons et le cœur. Ces nouveaux vaisseaux augmentent le volume total de l'appareil circulatoire ainsi, le corps doit compenser ce plus grand volume par une augmentation du volume du sang qui les remplit (Morici et al., 2016).

2) *Impact sur le système respiratoire*

Contrairement au système cardiaque qui peut être « entraîné », le système respiratoire est surdimensionné pour la ventilation requise au repos, il peut augmenter la ventilation plus de 20 fois pendant l'exercice par rapport à la valeur initiale mais ne peut pas améliorer ses performances au-delà de ses limites naturelles (McKenzie, 2012). En effet, les propriétés structurelles et fonctionnelles des poumons et les voies respiratoires restent essentiellement inchangées après l'entraînement (Morici et al., 2016).

Un certain nombre d'études sont en accord pour dire qu'un entraînement physique continu à faible intensité améliore l'oxydation des graisses et induit des changements similaires chez des hommes en bonne santé (Aggel-Leijssen et al., 2001, 2002; Schrauwen et al., 2002). Ces

augmentations observées dans l'oxydation des graisses après l'entraînement physique pourraient être attribuables à une augmentation du contenu mitochondrial (Gollnick & Saltin, 1982) ou à une activité accrue de la carnitine palmitoyltransférase-1, une étape importante limitant la vitesse de l'absorption mitochondriale des AG et de l'oxydation subséquente. En effet, des études transversales ont rapporté que l'activité CPT-1 est réduite dans le muscle squelettique des individus obèses (Kim et al., 2000) et est augmentée dans le muscle des individus entraînés par rapport aux individus non entraînés (Jong-Yeon et al., 2002; Starritt et al., 2000).

3) Impact sur les muscles squelettiques

L'entraînement en endurance permettrait d'engendrer une transition des fibres de type II vers les types I (Simoneau & Bouchard, 1989). Des exercices réguliers augmentent la densité des capillaires dans les fibres musculaires (Laughlin & Roseguini, 2009). En effet, Denis et collaborateurs (1986) (Denis et al., 1986) ont constaté que la densité des capillaires fournissant du sang au muscle en exercice chez les personnes de plus de 55 ans a augmenté à la suite d'un entraînement physique. D'autres études ont démontré des résultats similaires pour les moins de 55 ans (Ingjer, 1979; Klausen et al., 1981). L'augmentation de la densité chez les plus jeunes était liée à la croissance capillaire, tandis que chez les adultes elle était liée à une réduction de la surface des fibres musculaires. De plus, l'activité d'endurance augmente absorption d'oxygène (Jones et al., 2017) et améliore la capacité du squelette muscles pour produire de l'énergie par le métabolisme oxydatif (Nader, 2006) en raison d'une augmentation du nombre et de la taille des mitochondries dans les muscles entraînés (Holloszy et al., 1970). En effet, l'activité des enzymes clés des voies métaboliques oxydatives est augmentée en réponse à un entraînement en endurance chez des sujets sains (Messonnier et al., 2001). De plus, l'entraînement en endurance augmente la part des lipides utilisés pour produire de l'ATP lors d'un exercice ce qui conduit à une diminution de l'utilisation du glycogène et donc conduisant à une diminution de la lactatémie (Brooks & Mercier, 1994; San-Millán & Brooks, 2018).

L'entraînement en endurance améliore les processus de recyclage du lactate et permet de réduire la lactatémie pour un exercice d'intensité absolue (Messonnier et al., 2013). L'oxydation du lactate par l'enzyme LDH va produire un pyruvate, pouvant rejoindre le métabolisme oxydatif. Lors d'un exercice incrémental, les seuils lactiques 1 et 2 (SL1 et SL2) observables par des points d'inflexion sur la courbe de lactatémie seront repoussés à des intensités plus élevées et l'entraînement en endurance permettra à terme d'effectuer un effort

d'intensité absolue et relative plus élevées tout en maintenant une lactatémie en dessous du seuil critique. Une étude a montré aussi que l'entraînement en endurance augmentait la quantité de protéine impliquée dans l'approvisionnement du glucose et de l'homéostasie du pH permettant ainsi d'augmenter l'intensité de l'effort en conservant l'homéostasie musculaire (Juel, 2006).

Des études se sont intéressées aux bénéfices structuraux et énergétiques de l'entraînement en endurance dans la population générale et pathologique, et ont rapporté que la réponse consistait en une amélioration de la surface de section des fibres musculaires et de leur capacité oxydative par l'augmentation notamment de l'activité des enzymes mitochondriales (Bankolé et al., 2016; Messonnier et al., 2001). Juel a aussi montré que l'entraînement en endurance améliorait le contenu musculaire en protéines impliquées dans la régulation du pH musculaire (MCT1, MCT4, GLUT1, et GLUT4 essentiellement) (Juel, 2006).

4) Impact sur la santé mentale et la cognition

De nombreuses études soutiennent l'activité physique comme une thérapie non invasive pour l'amélioration de la santé mentale (Beier et al., 2014; Bielak et al., 2014; Tian et al., 2014), la dépression (Kratz et al., 2014; McKercher et al., 2014) mais aussi de l'anxiété (Greenwood et al., 2013; Nishijima et al., 2013; Schoenfeld et al., 2013), des maladies neurodégénératives (Mattson, 2014) et de la toxicomanie (Lynch et al., 2013; Zlebnik et al., 2012).

De nombreuses améliorations de la fonction cognitive liées à l'exercice ont été associées à l'expression locale et systémique de facteurs de croissance dans l'hippocampe, notamment le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (Cotman & Berchtold, 2002; Neeper et al., 1995).

5) Des bénéfices retrouvés chez les patients pathologiques

a) Maladies cardiaques

Dans la BPCO, l'exercice régulier est connu pour améliorer la forme physique et induire également des changements dans la structure musculaire, la régulation du renouvellement des protéines musculaires, l'activité des enzymes mitochondriales, le stress oxydatif et l'inflammation (Gouzi et al., 2013). Plus précisément et en accord avec des travaux précédents (Eliason et al., 2010; Hepple et al., 1998, 2000), il a été observé une augmentation du rapport

capillaire/fibre, indiquant potentiellement une amélioration induite par l'entraînement dans la capacité à transférer l'O_2 aux myofibres chez les patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive et les sujets sains sédentaires (Gouzi et al., 2013) (Figure 25).

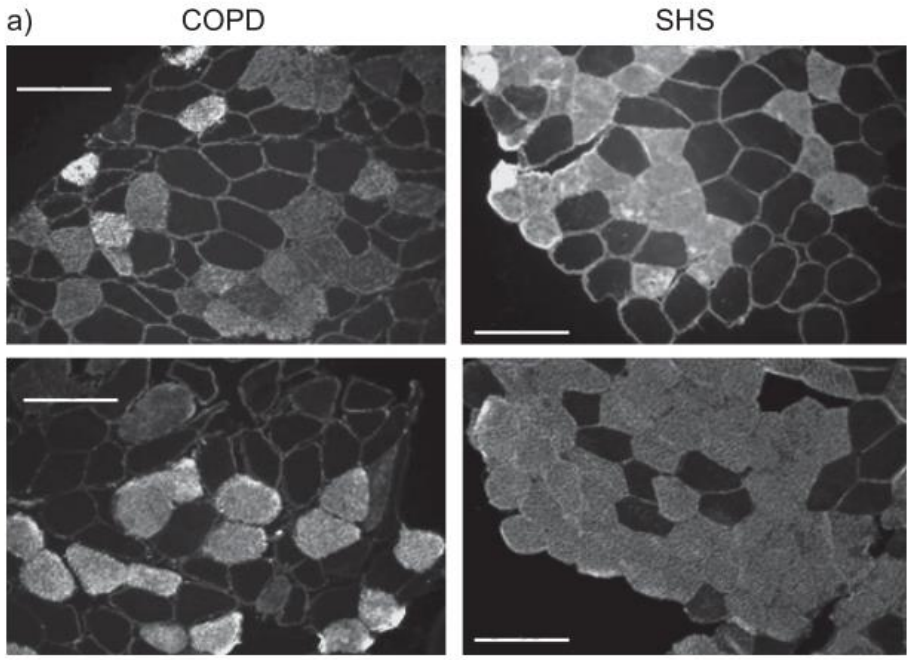


Figure 25 : Images représentatives de la capillarisation du vaste latéral après coloration pour le marqueur endothélial CD31, chez un patient atteint de maladie pulmonaire obstructive chronique (COPD) et un sujet sain sédentaire (SHS) avant (rangée supérieure) et après (rangée inférieur) l'exercice. D'après (Gouzi et al., 2013).

b) Diabète de type II, résistance à l'insuline et obésité

L'activité physique, et plus particulièrement lorsque la dépense énergétique est maintenue constante pendant les séances d'exercice quotidiennes, est un moyen simple et efficace par lequel la sensibilité à l'insuline peut être améliorée chez les patients obèses et diabétiques (type 2) (Venables & Jeukendrup, 2008). L'obésité, considérée comme une maladie chronique de la nutrition est une affection couramment associée à une élévation des acides gras plasmatiques ainsi qu'à une résistance à l'insuline et à une hyper-insulinémie, deux facteurs de risque importants dans le développement du diabète sucré de type 2 et des maladies cardiovasculaires. L'exercice d'endurance aérobie est donc préconisé comme le mode d'exercice le plus approprié. Ces recommandations proviennent, dans une large mesure, de l'effet prononcé de l'exercice aigu sur le métabolisme du glucose, de l'insuline et des lipides observé principalement chez les patients sains non diabétiques (Eriksson, 1999).

Non seulement l'exercice aigu améliore la sensibilité à l'insuline jusqu'à 48 h (Perseghin et al., 2013) mais un entraînement physique régulier peut induire des changements à long terme dans le muscle squelettique. Il n'y a pas de consensus concernant le type, l'intensité et la durée de l'exercice requis pour améliorer la sensibilité à l'insuline mais certaines études suggèrent que seuls des exercices de haute intensité (effort à FC maximale) peuvent l'améliorer (Borghouts et al., 1999; Kang et al., 1996; Segal et al., 1991). D'autres ont montré que des exercices d'intensité légère à modérée peuvent être tout aussi efficaces (Kang et al., 1996; Oshida et al., 1989). Plus récemment, Houmard et al. ont montré que c'est la durée de l'exercice qui est importante pour déterminer les améliorations de la sensibilité à l'insuline, quelle que soit l'intensité (Houmard et al., 2004). En effet, la résistance à l'insuline joue un rôle central dans la pathogenèse du diabète sucré de type 2. L'association entre l'inactivité physique et la résistance à l'insuline a été suggérée il y a plus de 50 ans et il s'avère aujourd'hui que les athlètes d'endurance ont une plus grande sensibilité à l'insuline que leurs homologues sédentaires (Lohmann et al., 1978; Seals et al., 1984).

IV. Impact de l'entraînement chez les patients drépanocytaires

1) Remodelage microvasculaire

Dans une population saine ou pathologique, l'entraînement en endurance améliore le réseau microvasculaire avec une augmentation de la densité capillaire et/ou de la tortuosité des micro-vaisseaux, permettant ainsi une plus grande surface d'échange entre les deux compartiments et une meilleure oxygénation musculaire (Andersen & Henriksson, 1977; Baum et al., 2015; Charifi et al., 2004; Gouzi et al., 2013; Messonnier et al., 2001). Une étude chez les porteurs du traits drépanocytaires (SCT) a mis en évidence une plus grande densité capillaire chez les sujets les plus actifs en comparaison aux sujets sédentaires (Vincent et al., 2012). Il semblerait cependant que les caractéristiques du réseau microvasculaire des patients SCD soient susceptibles d'interférer sur ces bénéfices précédemment cités. En effet, les patients drépanocytaires auraient une raréfaction des micro-vaisseaux, une diminution de leur tortuosité mais aussi un élargissement de ces micro-vaisseaux par rapport aux sujets sains (Ravelojaona et al., 2015).

Une étude récente de Merlet et collaborateurs a montré que chez les patients drépanocytaires, les caractéristiques morphologiques des capillaires telles que le périmètre, la surface, le diamètre et la tortuosité restaient inchangés après un entraînement de 8 semaines

(Merlet et al., 2019). Il a été supposé que l'élargissement et la faible tortuosité des micro-vaisseaux pouvaient constituer un mécanisme protecteur des troubles hémodynamiques et hémorhéologiques pendant l'exercice, facilitant ainsi l'apport d'oxygène au tissu musculaire.

2) Bénéfices structuraux et énergétiques

Chez les patients SCD, ces différents bénéfices ont notamment été remarqué avec une augmentation de la surface de section des fibres musculaires en réponse à l'entraînement. La surface de section des fibres de type I a significativement augmenté par rapport au groupe contrôle réduisant ainsi l'hypotrophie (Merlet et al., 2019)

Au niveau des activités enzymatiques, il a été révélé dans cette même étude, une augmentation des enzymes oxydatives (CS, β-HAD, CIV, et Cox) (Figure 26) et une augmentation du contenu protéique musculaire de la plupart des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire (NDUFB8, UQCRC2, MTCO1 et ATP5A). En revanche, les résultats de cette étude ont également montré que le contenu musculaire en protéines GLUT4, CAII, CAIII, MCT1 et MCT4 était resté inchangé à l'issue de l'entrainement (Merlet et al., 2020). L'absence d'adaptation spécifique des mécanismes de régulation du pH (CAII et CAIII, MCT1 et MCT4) intramusculaire pourrait renforcer l'idée que ce mode d'entraînement semble maintenir les patients SCD à l'écart du danger et notamment de l'acidose liée à l'exercice intense.

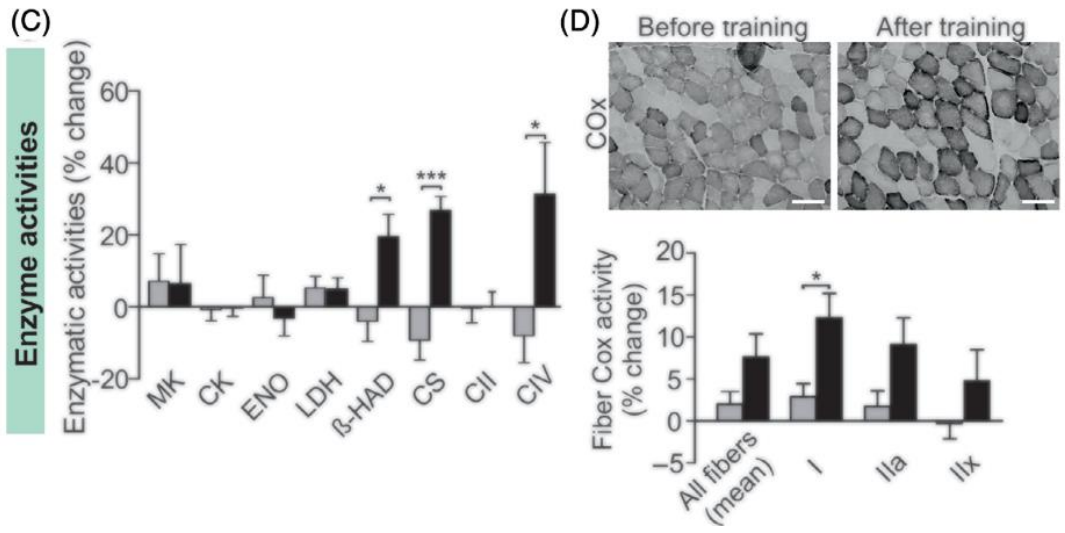


Figure 26 : (C) Variation en % des activités enzymatiques dans le groupe entraîné et non-entraîné. (D) Variation en % de l'activité des fibres COx dans le groupe entraîné et non-entraîné. Extrait de (Merlet et al., 2020).

3) *Impact de l'entraînement en endurance sur le potentiel régénératif*

Dans une étude récemment publiée de Januel et collaborateurs (Januel et al., 2022), les analyses immunohistochimiques en fluorescence réalisée sur les biopsies musculaires des patients SCD ayant effectué un entraînement en endurance (30 min conduisant à un état d'équilibre des concentrations de lactate dans le sang à environ 2,5 mmol·L^{-1}) n'ont montré aucune fibre nécrotique ce qui suggère que le protocole d'entrainement n'a pas engendré de dégradation tissulaire notable. Cet argument supplémentaire témoigne de l'innocuité de ce type d'entrainement pour le tissu musculaire. Les résultats ont aussi rapporté une forte tendance à l'augmentation voir au maintien, de la surface transversale des fibres musculaires de type I des patients entrainés par rapport aux patients contrôles ($p = 0.05$) avec un nombre de myonucléi par fibres qui avait tendance à augmenter dans le groupe entrainé par rapport à celui du groupe contrôle ($p = 0.07$). De plus, après les 8 semaines d'entrainement, les indices de régénération c'est-à-dire, le contenu en cellules satellites, le nombre de noyaux internalisés, le nombre de fibres en régénération et le nombre de cellules satellites actives, sont restés inchangés.

Ces différents résultats mettent en évidence les effets d'un entraînement en endurance d'intensité modérée sur le potentiel de régénération musculaire des patients SCD et démontrent que celui-ci est sans danger pour le tissu musculaire et qu'il entrainerait une légère hypertrophie des fibres musculaires de type I (Januel et al., 2022) (Figure 27).

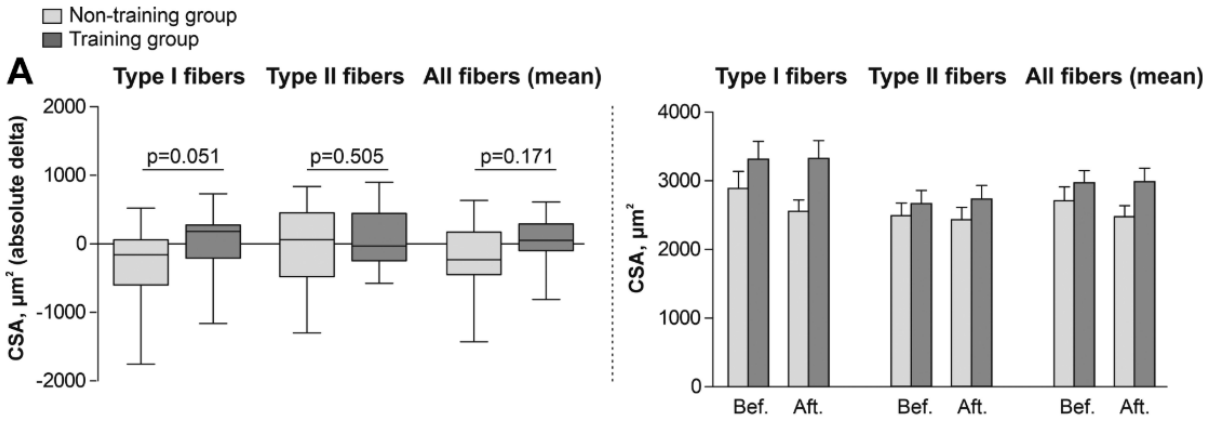


Figure 27 : Effets de l'entraînement physique d'endurance sur la surface de fibre musculaire pendant l'entraînement par rapport aux patients non entraînés. Extrait de (Januel et al., 2022).

4) *Impact de l'entraînement en endurance sur la fonction musculaire et les réponses physiologiques à l'exercice des patients SCD*

L'entraînement en endurance à intensité modérée (70% de la $\dot{V}O_2$ max) induit une optimisation de l'utilisation de l'oxygène et permet d'expliquer la moindre accumulation sanguine de lactate, ainsi que l'optimisation du quotient respiratoire. De plus, la fréquence respiratoire des patients drépanocytaires pour une même puissance à l'exercice a diminué démontrant une amélioration de la fonction ventilatoire chez les patients drépanocytaires.

Dans une récente étude de Gellen et collaborateurs, les patients SCD ont suivi un entraînement en endurance de 8 semaines. Celui-ci consistait en une session sur ergomètre de 45 minutes à raison de 3 fois par semaine (Gellen et al., 2018). Chaque patient avait une puissance cible définie en fonction des concentrations de lactate sanguin lors du test initial (seuil limite d'une acidose à risque de 4 $mmol \cdot L^{-1}$). La séance débutait par un échauffement de 5 minutes puis 3 minutes à 70% de la puissance cible suivi d'un exercice de 2 minutes pendant lesquelles la puissance augmentait progressivement de 70% à 100%. La puissance cible était ensuite maintenue pendant 30 minutes avec une cadence de pédalage de 60 rotations par minute. Les résultats ont montré qu'à l'issue de cet entraînement, les patients SCD ont augmenté leur puissance avant d'atteindre 4 $mmol \cdot L^{-1}$.

5) *Cas des sujets porteurs du trait drépanocytaire*

Bien qu'étant porteurs du trait et considérés comme asymptomatiques, les sujets SCT peuvent être à risque lors d'exercices à intensité maximale car ils sont également soumis à un stress oxydatif (Chirico et al., 2012), une inflammation, des troubles hémorhéologiques (Connes et al., 2006; Tripette et al., 2010) et présenteraient des hématies falciformes après exercice (Bergeron et al., 2004; Connes et al., 2006). Dans le sport de haut-niveau, il a été rapporté d'une part que sujets SCT remportaient moins de courses d'endurance que les sujets ayant une hémoglobine normale (Le Gallais, 1991). D'autre part, une étude de Connes et ses collaborateurs (Connes et al., 2006) a démontré que la puissance maximale et le travail diminuaient plus rapidement au cours d'un exercice de sprints répétés chez les SCT que chez des sujets sains. Pour expliquer ces différents résultats, il a été émis l'hypothèse que le

métabolisme aérobie pouvait être altéré (Edge et al., 2006) sans pour autant altérer les valeurs de consommation maximale en oxygène et de puissance maximale aérobie (Bilé et al., 1998).

Pourtant le trait drépanocytaire semble être un facteur limitant la performance en endurance (Le Gallais et al., 1994) et l'augmentation de l'amplitude de la composante lente de $\dot{V}O_2$ observée chez les sujets SCT témoignerait d'une plus faible endurance aérobie et d'une forme d'intolérance à l'exercice sous-maximal intense et prolongé (Connes et al., 2011). Bile et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse que pour compenser ce métabolisme oxydatif altéré, les sujets SCT pourraient augmenter la part des mécanismes glycolytiques non-oxydatifs (Bilé et al., 1996). Une autre étude renforce cette idée avec des valeurs de lactatémies plus élevées chez des sujets SCT par rapport à des sujets sains à la suite d'un exercice progressif (Freund et al., 1995). Les auteurs ont attribué les plus fortes lactatémies à une plus forte production de lactate car les aptitudes à échanger et éliminer le lactate étaient identiques entre les deux groupes.

Une autre étude de Messonnier et collaborateurs a révélé (i) des accumulations musculaires et sanguines de lactate plus faibles en réponse à un court exercice de haute intensité, (ii) une teneur musculaire plus élevée en MCT4 et (iii) une diminution plus rapide des concentrations de lactate sanguin pendant la récupération, que les homologues témoins. Dans l'ensemble, les accumulations plus faibles de lactate sanguin et musculaire peuvent agir comme des mécanismes de protection contre la falciformation (et donc les COV) ce qui peut expliquer les complications relativement rares et la mort subite observées chez les sujets SCT, et contre les effets intracellulaires délétères du lactate et de l'acidose associée sur la fonction musculaire, qui peuvent expliquer la forte représentation de sujets SCT parmi les meilleurs sprinteurs de courte distance (Messonnier et al., 2022).

V. L'entraînement en endurance comme stratégie thérapeutique

À l'heure actuelle, l'exercice chez les personnes atteintes de drépanocytose doit être adapté individuellement et surtout être réalisé à une intensité modérée. Il doit être également contrôlé, de préférence effectué sous la supervision de professionnels de santé. Evidemment, cela s'applique également aux enfants malgré leur capacité oxydative plus élevée par rapport aux adultes (Ratel & Blazevich, 2017) ce qui potentiellement réduit les risques liés à l'acidose sanguine.

1) *Des études sur les enfants prometteuses*

Liem et al. (Liem et al., 2017) ont montré pour la première fois la faisabilité et la sécurité d'un entraînement à domicile de 12 semaines, sur ergomètres, chez des enfants SCD. Aucun événement indésirable majeur n'est survenu pendant la période d'entraînement mais les effets bénéfiques de l'intervention d'entraînement à domicile sur la capacité physique des enfants SCD étaient limités.

Bien qu'une augmentation de la consommation maximale moyenne d'oxygène et de la charge de travail maximale en cyclisme ait été observée après 7 semaines d'entraînement, il n'y a cependant pas eu d'amélioration significative des paramètres hématologiques et cardiopulmonaires après 12 semaines d'entraînement.

2) *Type d'entraînement et récurrence*

L'exercice d'intensité modérée a démontré son innocuité chez les patients drépanocytaires. Dans ces différentes études (Faes et al., 2014; Hedreville et al., 2014; Liem et al., 2017) les patients effectuaient des exercices qui pouvaient aller jusqu'à 30 minutes sans complications cliniques grave. Ainsi, dans ce contexte, la pratique d'une activité semble possible, individualisée à l'aptitude physique de chacun.

Zanoni et ses collaborateurs ont observées que 12 semaines de thérapie aquatique sont efficaces pour traiter les dysfonctionnements musculosquelettiques et pour augmenter la force musculaire de la flexion du tronc et de l'extension et de l'abduction de la hanche (Zanoni et al., 2015). Camcioğlu et collaborateurs ont observé une amélioration de la force des muscles respiratoires chez un patient SCD après 12 semaines d'entraînement des muscles inspiratoires (Camcıoğlu et al., 2015). Les 8 semaines d'entraînements proposé par Merlet (Merlet et al., 2019) ont été suffisantes pour observer des bénéfices fonctionnels et tissulaires analogues à l'adaptation physiologique à l'exercice habituel. Ainsi, il pourrait être pertinent de proposer ce mode d'entrainement en endurance à domicile et contrôlé par un suivi rapproché permettant à terme de rendre le patient autonome (Figure 28).

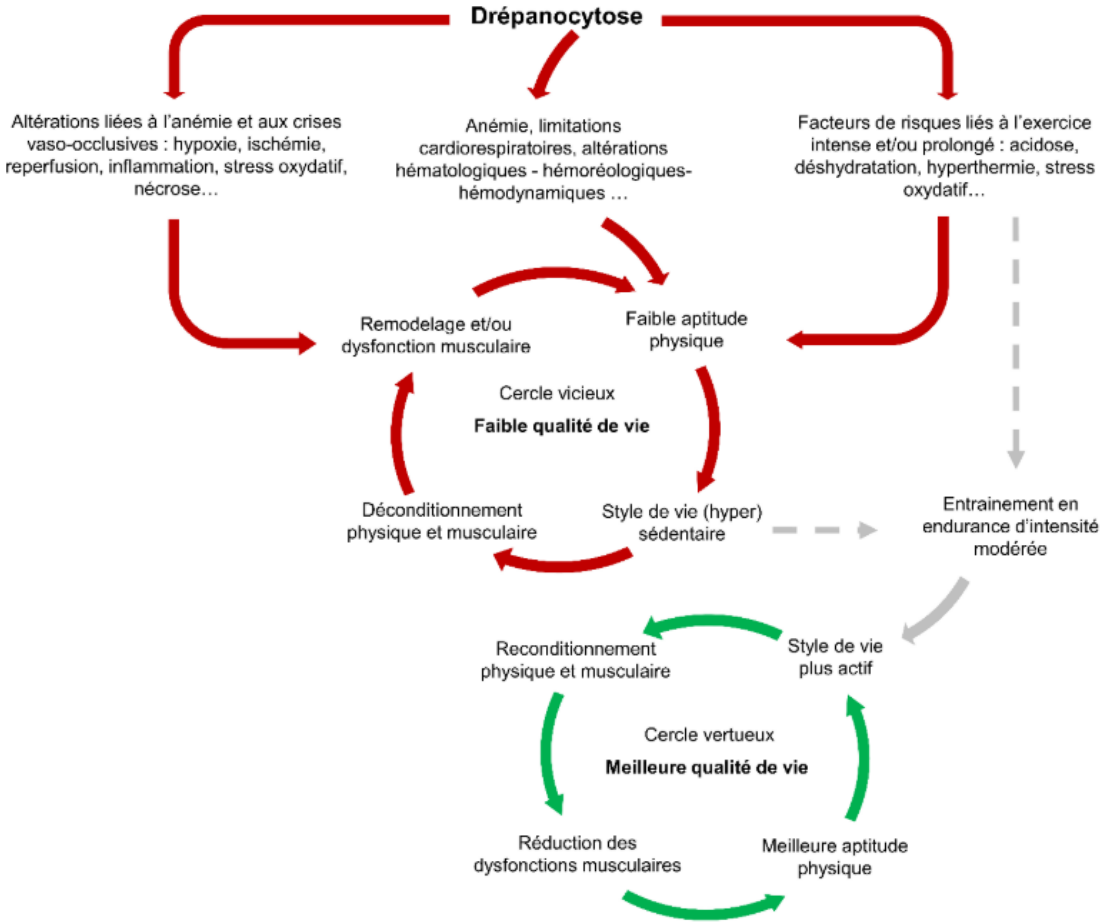


Figure 28 : Schéma du cercle vicieux au cercle vertueux proposé par Merlet (2019) : bénéfices liés à la pratique d'une activité physique adaptée chez le patient drépanocytaire.

En revanche, malgré tous les bénéfices démontrés par l'entraînement en endurance sur les patients drépanocytaires, certaines interrogations demeurent notamment sur l'impact de l'entraînement en endurance sur l'angiogenèse, la biogenèse mitochondriale et le métabolisme énergétique. Par ailleurs, plusieurs analyses complémentaires aux données de Merlet et al. ont semblé pertinentes et ont été avancées dans cette thèse avec l'étude n°2 portant sur l'effet de l'entraînement en endurance sur la flexibilité métabolique pendant l'exercice chez les patients drépanocytaires. Les études portant sur la thérapie par l'exercice dans la drépanocytose sont prometteuses mais d'autres investigations avec des cohortes plus importantes sont nécessaires pour trouver le protocole d'entraînement le plus approprié, espérer améliorer la fonction musculaire, la capacité physique, la santé globale et la qualité de vie des patients SCD. Cela permettrait de pouvoir conclure définitivement sur l'intérêt thérapeutique d'une activité physique régulière chez les patients SCD et établir des programmes d'entraînement individualisés.

Chapitre 5 : Les modèles murins dans la drépanocytose

L'étude de pathologies et des facteurs aggravants est relativement difficile et parfois éthiquement discutable (pour peu que les risques soient jugés élevés) sur l'Homme. Pour comprendre les mécanismes sous-jacents à la drépanocytose, découvrir les nouveaux aspects de la physiopathologie ou encore tester différentes interventions thérapeutiques, plusieurs équipes ont développé des modèles murins détaillés ci-dessous dans ce chapitre n°5.

1) La souris SAD

La souris SAD a été mise au point en 1990 par les équipes du Dr M. Trudel à Montréal et du Dr Y. Beuzard à Paris. La souris SAD est un modèle de souris drépanocytaire génétiquement modifié. Un transgène codant pour l'α_2-globine humaine et la β-globine de synthèse, β^{SAD} (βS-Antilles-D-Punjab) a été introduit dans une lignée de cellules germinales de souris C57Bl/6 (Trudel et al., 1991). Ce transgène β^{SAD} est issu du gène de la β^S globine humaine (Hb mutée drépanocytaire) auxquels les deux autres mutations impliquées dans la drépanocytose ont été insérés, la mutation $\beta^{Antilles}$ et la mutation $\beta^{D\text{-}Punjab}$ (Figure 29). L'insertion de ce transgène induit l'expression d'environ 19% d'hémoglobine SAD chez les souris SAD tandis que le taux d'HbS chez les patients drépanocytaires est d'environ 95% (Tableau 31). Ainsi, l'hémoglobine SAD n'est ni identique, ni présente en quantité équivalente à l'HbS ce qui limite considérablement l'utilisation de ce modèle. Celle-ci présente un temps de polymérisation très rapide comparé à celui de l'HbS de par sa faible solubilité en situation désoxygénée (Trudel et al., 1991).

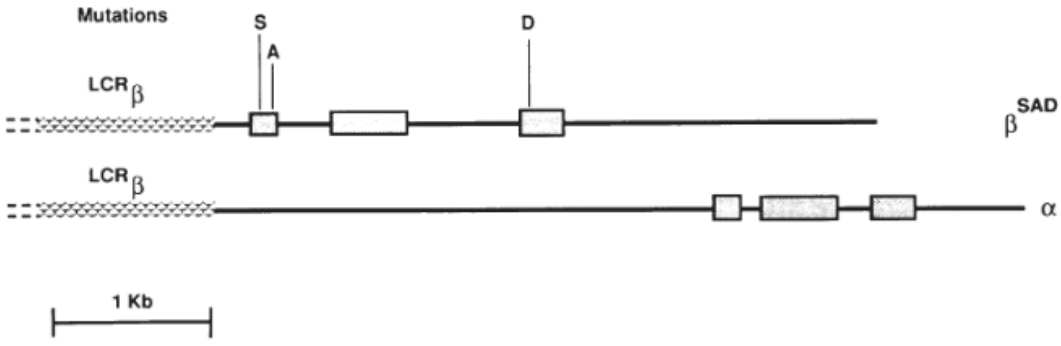


Figure 29 : Construction des gènes α- et β-globine utilisés pour générer la souris SAD.
D'après la thèse de E. Charrin (2017).

Enfin, l'espérance de vie des souris SAD est réduite par rapport à des souris contrôles de fond génétique identique (15 ± 7 mois pour les SAD contre 23 mois pour les C57Bl6/J et 28 mois pour les CBA/J) (Trudel et al., 1994).

a) Hématologie

Les souris SAD affichent un faible nombre de drépanocytes irréversibles et une légère augmentation de la densité érythrocytaire. Contrairement aux humains, elles sont anémiques à la naissance probablement du fait de l'absence d'hémoglobine fœtale chez les souris mais une fois adulte, l'anémie est ensuite corrigée (Tableau 31) (Trudel et al. 1994).

b) Différents dommages notables

- Dommages spléniques : Les souris SAD souffrent d'une hypertrophie splénique et de la formation de dépôts hémosidérines (Tableau 31) dût à la responsable forte séquestration de globules rouges (Trudel et al., 1994).

- Dommages pulmonaires : Les poumons observés sur des souris mortes SAD et ayant été soumises à un stress hypoxique, présentent une congestion modérée des capillaires associée à des dépôts hémosidérines alvéolaires visibles (Tableau 31). De légers infarctus, hémorragies et thromboses sont également observables après autopsies (Trudel et al., 1994).

- Dommages rénaux : Les glomérules rénaux sont sclérosés, congestionnés et riches en dépôts hémosidérines chez environ une souris SAD sur deux (Tableau 31) (Trudel et al., 1994).

- Dommages hépatiques : Une congestion du foie des souris SAD entraine des dépôts hémosidérines ainsi qu'une forte érythrophagocytose (englobement des hématies par des cellules phagocytaires) associée à une hyperplasie des macrophages hépatiques (Tableau 31).

Le modèle SAD est aujourd'hui délaissé par les équipes de recherche par la relative faible sévérité de la maladie chez ces souris et la forte variabilité phénotypique intra-souche.

2) *Le modèle de souris BERK*

Pászty et al. ont développé la souris de fond génétique multiple BERK (Pászty et al., 1997) chez laquelle les gènes de globines murines α et β ont été invalidées et un transgène portant les globines α, β^S, $^A\gamma$, $^G\gamma$ et β humaines a été inséré. Ces souris expriment quasiment exclusivement l'hémoglobine humaine et présente alors un grand nombre de similarités physiopathologiques avec les patients humains (falciformation érythrocytaire associée à une hémolyse intravasculaire, anémie sévère, inflammation chronique, infarctus, congestion et surcharge en fer dans de multiples organes) (Manci et al., 2006). En revanche, sur certains autres aspects, le comportement de la souris BERK est différent de celui des patients drépanocytaires comme par exemple, des valeurs de CCMH normales ou plus basses que la moyenne. Des splénomégalies (augmentation anormale du volume de la rate) sont aussi rapportées chez ce modèle de souris.

Enfin, les nouveau-nés BERK ont une concentration d'HbF inférieure comparée à celle des nouveau-nés humains, réduisant leur protection contre les effets délétères de l'HbS et causant une forte mortalité néo-natale des souriceaux BERK (Manci et al., 2006) (Tableau 31). Très utilisé la décennie précédente, le modèle BERK est encore utilisé de nos jours malgré l'émergence de nouveaux modèles.

3) *La NY1DD*

La NY1DD (ou $\alpha^H\beta^S[\beta^{MDD}]$) est une souris de fond génétique C57Bl/6, homozygote pour la délétion sur le locus du gène de globine murine β^{major} exprimant un transgène de globines α et β^S humaines. Ce modèle n'est pas anémique en l'absence de stress particulier mais présente une fraction accrue d'HbS et certaines anomalies hématologiques caractéristiques de la drépanocytose (une densité érythrocytaire élevée, forte affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène et hyper-réticulocytose) (Kaul et al., 1983).

En présence de stress hypoxique ou réoxygénation, il y a une réponse inflammatoire avec adhérence des leucocytes à l'endothélium (Kaul & Hebbel, 2000) et activation du NF-κB (Osarogiagbon et al., 2000).

4) *Les souris S+S-Antilles*

Développées par Fabry et collaborateurs, ce modèle de souris est un croisement entre les souris NY1DD et des souris $\alpha^{H}\beta^{S\text{-}Antilles}$. Ces souris expriment donc la mutation $\beta^{S\text{-}Antilles}$ et présentent une baisse de l'affinité pour l'oxygène ainsi qu'une diminution de la solubilité de l'hémoglobine comme c'est le cas pour les souris SAD (Fabry et al., 1995). Elles présentent une plus grande quantité de globules rouges denses et d'une plus grande sévérité que les souris NY1DD (Fabry et al., 1995; Solovey et al., 2004).

Les souris de ce modèle ne sont pas anémiques mais présentent une hémolyse, compensée par une réticulocytose. Des globules rouges sont séquestrés dans le poumon, le foie et des infarctus ont aussi été observé (Beuzard, 2008). Enfin, des anormalités du tonus vasculaire et une diminution de la relaxation des vaisseaux ont été décrites et pourraient être causées par des peroxydations lipidiques accrues. Celles-ci viendraient diminuer la biodisponibilité du NO (Nath et al., 2000).

I. Le modèle de souris Townes

Pour faire face au problème d'évolution ontogénique de l'hémoglobine (Hb), un modèle de souris drépanocytaires a été développé afin d'imiter l'évolution de la proportion des différentes Hb décrite chez l'Homme drépanocytaire (Ryan et al., 1997).

1) *Particularité de la souris Townes*

Ce modèle de souris transgénique issu des croisements sur plusieurs générations des souches (C57Bl6J et 129S1/SvImJ) exprime exclusivement de l'hémoglobine humaine. Son gène d'hémoglobine présente trois mutations type « knock-in » (Figure 30) :

- La mutation $Hba^{tm1(HBA)Tow}$ ou hα, correspondant à l'invalidation du gène codant pour l'α-globine endogène et remplacé par le gène α humain,
- La mutation $Hb^{btm2(HBG1,HBB)Tow}$ ou -1400 γ-β^{S} construite par l'insertion des gènes γ-globine et β^{S}-globine remplaçant les gènes β-globine murins,
- La mutation $Hbb^{tm3(HBG1,HBB)Tow}$ ou -383 γ-β^{A}, conçue par l'invalidation des gènes β-globine murins et l'insertion des gènes γ-globine et β^{A}-globine humains.

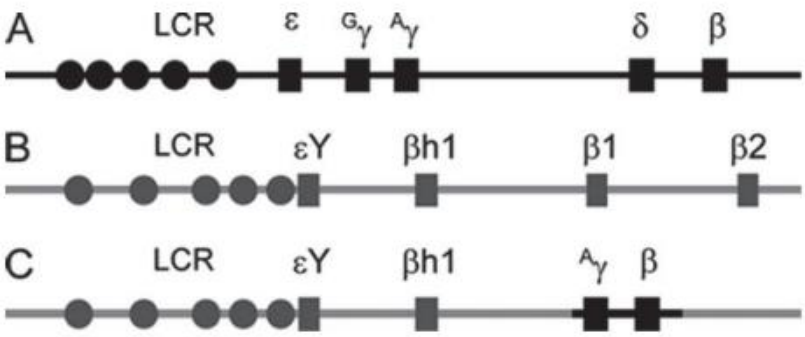


Figure 30 : Construction des gènes α-, β- et γ-globines de la souris Townes. D'après la thèse de E. Charrin (2017).

Toutes les souris sont homozygotes sur le locus hα, mais peuvent être soit homozygotes β^A/β^A de phénotype sain, soit homozygotes β^S/β^S de phénotype drépanocytaire humain, soit hétérozygotes β^A/β^S. L'hémoglobine exprimée par les souris pendant la phase de croissance est la même que celle exprimée à l'âge adulte et la souris Townes a la particularité de synthétiser de l'hémoglobine fœtale dominante en fin de gestation et durant la phase néonatale.

Tout comme chez l'Homme, la synthèse d'hémoglobine fœtale (HbF) diminue ensuite progressivement pour être produite en très faible quantité à l'âge adulte (Ryan et al., 1997). Ainsi, à partir de la 3ème semaine post-natale la souris Townes commence alors à développer les caractéristiques physiopathologiques de la drépanocytose notamment une anémie sévère (Wu et al., 2006). Malgré un phénotype drépanocytaire sévère, les souris Townes peuvent survivre jusqu'à 15 mois (Potoka & Gladwin, 2015).

2) Hématologie, hémorhéologie et stress oxydant

Les souris Townes présentent des GR déformés, moins nombreux et moins volumineux ainsi qu'une moindre concentration en Hb par rapport aux souris contrôles pourtant issues de la même lignée mais qui possèdent de l'HbA humaine à la place de l'HbS (Ryan et al., 1997). Le nombre élevé de réticulocytes présenté par les souris drépanocytaires témoigne d'une érythropoïèse plus élevée (Ryan et al., 1997) ce qui ferait vraisemblablement réponse à l'hémolyse caractéristique de la drépanocytose causée par la fragilité des GR falciformes (Rees et al., 2010).

Les souris Townes SS souffrent aussi d'hyper-réticulocytose témoignant de l'anémie ou de l'hémolyse, une augmentation du nombre de réticulocytes circulant à l'état stable reflétant une inflammation chronique et systémique, caractéristique du phénotype humain (Charrin et al., 2016). Pour maintenir une viscosité sanguine stable et limiter les risques de CVO, les souris Townes SS auraient un phénomène compensatoire, induisant une altération de la déformabilité érythrocytaire et sans dégradation de la viscosité sanguine. De plus, deux variabilités de formes et de diamètres des hématies observables chez les patients SCD sont également observables chez les souris Townes (SS) (poïkilocytose et anisocytose) (Wu et al., 2006).

3) Différents dommages notables

- Dommages spléniques : Chez les souris Townes SS, la rate est largement hypertrophiée, son poids moyen est 7 fois supérieur à celui des AA et AS. Dans cet organe, les signes d'anémie et de vaso-occlusion se manifestent par des dépôts hémosidérines (pigment insoluble contenant de l'hydroxyde de fer), une congestion et des infarctus localisés (Wu et al., 2006).

- Dommages pulmonaires : Les poumons des souris Townes sont altérés après un stress. En effet, les autopsies révèlent des poumons congestionnés ainsi que des œdèmes et hémorragies localisées (Ghosh et al., 2013) (Tableau 31).

- Dommages rénaux : Des micro-occlusions vasculaires surviennent dans les reins des Townes SS entrainant congestion et glomérulosclérose, une atteinte irréversible des capillaires glomérulaires (Tableau 31) (le glomérule constitue la première barrière de filtration rénale entre le sang et l'urine primitive). Ces altérations rénales perturbent l'osmolalité de l'urine alors anormalement diluée chez les Townes SS (Wu et al., 2006).

- Dommages hépatiques : Le foie des souris SS affiche une hyperplasie des macrophages de Kupffer (propres au foie et au lobule hépatique, elles se déforment et émettent un certain nombre de prolongements cytoplasmiques) pour éliminer les nombreux déchets membranaires dus à l'hémolyse chronique. Il en résulte l'agrégation de pigments hémosidérines. De multiples complications sont les conséquences d'épisodes vaso-occlusifs hépatiques récurrents chez ces souris telles que la congestion et l'infarctus (Wu et al., 2006) (Tableau 31).

Ces souris sont occasionnellement sujettes à des crises vaso-occlusives pouvant aboutir à des dommages sévères aux niveaux de plusieurs organes tels que le foie, la rate ou les reins (Ryan et al., 1997). Cependant, malgré une anémie hémolytique sévère et des dommages tissulaires importants, plus de 90 % de ces souris survivent entre le 2ème et le 9ème mois et sont fertiles, ce qui en fait un modèle parfaitement utilisable dans l'étude de la drépanocytose (Ryan et al., 1997), notamment dans le cadre d'essais de thérapie génique (Wu et al., 2006).

4) Comparaison mâles et femelles chez les souris Townes

S'il existe des différences pathologiques entre les hommes et les femmes drépanocytaires, c'est aussi le cas chez les souris Townes. En effet, une étude récente a étudié les différences entre les mâles et les femelles de ce modèle de souris. Les différences spécifiques au sexe chez les souris Townes drépanocytaires sont évidentes principalement dans la morphologie et la croissance de l'os trabéculaire et cortical, et elles sont liées à l'incapacité de l'os à résister à un stress mécanique élevé. Les souris femelles ont un os trabéculaire (constituant principal du corps des vertèbres, des os du poignet et du centre des os longs) moins dense que les souris mâles (Selma et al., 2022).

5) L'entraînement physique chez les souris Townes

Un entrainement physique modéré diminue l'inflammation chez des souris drépanocytaires Townes (Charrin et al., 2018). En effet, il a été observé que chez les souris SAD, un programme d'activité physique régulière en roue limite les effets délétères d'un stress vaso-occlusif dans le poumon et le cœur (Aufradet et al., 2014; Faes et al., 2015).

Dans l'étude de Charrin sur les souris Townes, il a été mis en évidence que le modèle apparaît très proche de celui de l'Homme, même à l'état stable contrairement au modèle SAD. En effet, à l'issue de 8 semaines d'entrainement sur tapis roulant à raison d'une heure de course par jour, 5 jours/semaine, des analyses ont déterminé les paramètres hématologiques, les marqueurs de l'inflammation systémique et rénale, le stress oxydant cardiaque et hépatique, l'hémolyse et l'aspect structural de la rate. Il s'est avéré que ces nouveaux résultats ont fournis des preuves des avantages multifocaux de l'entraînement physique chez les souris SCD en limitant la désoxygénation sanguine au repos, en réduisant l'inflammation systémique et

organique, en diminuant les niveaux de carboxyhémoglobine et en atténuant l'hypertrophie de la rate (Charrin et al., 2018).

Dans l'étude de Chatel, l'entraînement a induit des altérations fonctionnelles et métaboliques en réponse à l'exercice chez les souris Townes tandis que l'entraînement en endurance améliorerait pourtant ces différentes altérations dans plusieurs pathologies similaires. En corrigeant le faible approvisionnement musculaire en oxygène mais aussi en améliorant les mécanismes oxydatifs, l'entraînement en endurance pourrait favoriser l'utilisation de l'oxygène dans la resynthèse d'ATP. Ceci permettrait ainsi de diminuer l'acidose et l'accumulation de H^+ qui pourraient tous deux jouer un rôle dans l'occurrence de la fatigue (Chatel et al., 2017). Les deux mois d'entraînement en endurance pourraient être associés à une réduction de l'acidose intramusculaire induite par l'exercice et une amélioration de la fonction musculaire, ce qui pourrait être expliqué par une diminution de la contribution des mécanismes glycolytiques non-oxydatifs.

Pour résumé ce chapitre n°5, le modèle de souris Townes est à ce jour le plus approprié pour l'étude de la drépanocytose. D'abord, parce qu'il ne présente que de l'hémoglobine humaine, puis parce qu'il retrace le passage de l'HbF à l'HbS dans les premières semaines de la vie, et enfin car il permet d'étudier les formes homozygote et hétérozygote de la maladie notamment grâce à sa transmission autosomique récessive similaire à l'Homme.

	Patients drépanocytaires	Souris SAD H/R	Souris Townes
Anémie	✓[1]	×[2]	✓[3]
Hyperréticulocytose	✓[1]	×[2]	✓[3]
↓ nombre globules rouges	✓[1]	×[2]	✓[3]
↓ concentration hémoglobine	✓[1]	×[2]	✓[3]
↓ hématocrite	✓	×	✓[3]
Polychromatophilie	✓[1]	×	✓[3]
Anisocytose	✓[1]	×	✓[3]
Poïkilocytose	✓[1]	×	✓[3]
Rate			
Hypertrophie	puis atrophie[4]	✓[2,6]	✓[3]
Congestion	✓[5]	✓[6]	✓[3,7]
Dépôts hémosidérine	✓[5]	✓[6]	✓[3,7]
Infarctus	✓[5]	×[6]	✓[3]
Poumon			
Infarctus	✓[8]	✓[6]	?
Thromboses	✓[8]	✓[6]	?
Hémorragies	✓[8]	✓[6]	✓[10]
Œdèmes	✓[8]	×	✓[10,11]
Syndrome Thoracique Aigu	✓[9]	×	✓[10,11]
Rein			
Congestion	✓[12]	✓[6,13]	✓[3,7]
Glomérulosclérose	✓[12]	✓[6]	✓[3]
Dépôts hémosidérine	✓[12]	✓[6,13]	✓[3,7]
Foie			
Hyperplasie cellules Kupffer	✓[14]	✓[6]	✓[3]
Congestion	✓[14]	✓[6]	✓[3,7]
Dépôts hémosidérine	✓[14]	✓[6]	✓[3,7]
Erythrophagocytose	✓[14]	✓[6]	✓[3]
Infarctus	✓[14]	×	✓[3]

Tableau 31 : Récapitulatif des similitudes et différences entre les caractéristiques des modèles murins et de l'homme, extrait de la thèse de Emmanuelle Charrin, 2017.

OBJECTIFS ET HYPOTHESES DE RECHERCHE

Objectifs de la thèse

Avec environ cinq millions de personnes touchées dans le monde, la drépanocytose est la maladie génétique la plus répandue au monde. C'est une hémoglobinopathie due à une mutation du gène codant pour la bêta-globine et conduisant à la synthèse d'hémoglobine anormale S (HbS). Les conséquences pour les patients sont multiples et la principale d'entre elles est qu'en condition désoxygénée, l'hémoglobine S polymérise à l'intérieur du globule rouge (GR) et celui-ci prend alors la forme d'une faucille. Les principales manifestations cliniques sont une anémie hémolytique chronique et des crises vaso-occlusives. Leurs répercussions sur les organes vitaux sont majeures. Le muscle strié squelettique n'est pas épargné où des remodelages microvasculaires, structuraux et énergétiques sont observables. Outre ces premières complications évoquées, les patients drépanocytaires souffrent d'une désaturation artérielle, d'anomalies hématologiques et de désordres hémodynamiques perturbant l'approvisionnement en oxygène aux tissus. Ceci est particulièrement vrai dans les muscles actifs où la demande énergétique est élevée. Par ailleurs, les premiers travaux réalisés par notre équipe dans le cadre de la drépanocytose ont mis en évidence que le tissu musculaire de patients souffrait de répercussions de la maladie. Plus précisément, il a été mis en évidence une hypotrophie des fibres, une raréfaction du réseau microvasculaire, un élargissement des micro vaisseaux présents et une altération du potentiel énergétique oxydatif musculaire (Ravelojaona et al., 2015; Vincent, Féasson, Oyono-Enguéllé, Banimbek, Denis, et al., 2010). Ces éléments soulignent un défaut dans la capacité d'utilisation de l'oxygène par le muscle pour fournir de l'énergie par les voies métaboliques.

La littérature montre des différences physiopathologiques/cliniques entre les deux sexes, les femmes SCD semblant sur certains aspects cliniquement moins fragiles que les hommes. Les complications, les facteurs de risque, le taux de douleur ou de crise et la mortalité ont été signalés comme étant plus faibles dans les cohortes adultes ou pédiatriques de femmes que d'hommes atteints de drépanocytose (Baum et al., 1987; Detterich et al., 2019; Platt et al., 1994). L'hémoglobine et les données hématologiques peuvent expliquer en partie ces différences entre les sexes. Des études ont montré que les femmes drépanocytaires pouvaient être plus anémiques que les hommes et qu'elles pouvaient avoir un pourcentage d'HbS plus

faible (Delclaux et al., 2005; Detterich et al., 2019; Steinberg et al., 1995). Les femmes SCD ont également tendance à avoir une proportion d'hémoglobine fœtale (HbF) plus élevée (Dover et al., 1992; Steinberg et al., 1995) et une désaturation périphérique en oxygène moindre (Quinn & Ahmad, 2005). La biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO) et la réactivité au NO sont plus élevées chez les femmes que chez les hommes (Gladwin et al., 2003) permettant aux femmes SCD de développer moins de dysfonction endothéliale que leurs homologues masculins (Kim-Shapiro & Gladwin, 2018). Compte tenu du rôle du NO dans la régulation et la distribution du flux sanguin et l'homéostasie vasculaire, il se pourrait qu'il soit moins affecté dans leurs domaines microvasculaires et énergétiques que leurs homologues masculins. Finalement, ces différences peuvent donc conférer une protection aux patientes (Platt, Brambilla, et al., 1994). Toutefois, la traduction de ces différences au niveau musculaire reste inconnue. **Le premier objectif de ce travail de thèse a été de comparer les caractéristiques microvasculaires, structurales et énergétiques du muscle *vastus lateralis* de sujets féminins et masculins, sains, porteurs du trait drépanocytaire (SCT) et patients homozygotes SCD**. L'hypothèse testée était que le remodelage musculaire observé chez les hommes serait atténué chez les femmes.

La littérature montre également que la faible aptitude physique des patients, leurs faibles capacités aérobies musculaires et leur augmentation rapide du lactate à l'exercice sont tout au moins en partie dus à l'anémie. De nombreuses études ont étudié les effets bénéfiques d'un entraînement d'endurance d'intensité modérée dans de nombreuses pathologies comme chez des sujets SCT (Chirico et al., 2012; Vincent et al., 2012) et ont montré que les caractéristiques structurelles et fonctionnelles du muscle s'adaptaient à l'entraînement physique de manière quasi similaire et dans les mêmes proportions que les muscles des sujets témoins (Vincent et al., 2012). Il a été clairement démontré que la répétition de ce type d'exercice améliore l'apport d'oxygène avec une augmentation de l'intensité ou de la tortuosité des capillaires, contribuant à améliorer son utilisation par les muscles (Charifi et al., 2004; Messonnier et al., 2001) mais également des bénéfices microvasculaires avec une augmentation de la densité capillaire (CD), une augmentation du nombre de capillaires autour d'une fibre et de la surface d'échange fonctionnelle (Gellen et al., 2018; Merlet et al., 2019; Vincent et al., 2012). Sur le plan énergétique, l'entraînement en endurance permet une augmentation des enzymes impliquées dans le métabolisme aérobie permettant une meilleure absorption et utilisation de l'oxygène par les fibres musculaires (Gellen et al., 2018; Merlet et al., 2020). Enfin, aucune étude n'a montré d'effet significatif de l'entraînement en endurance sur la flexibilité métabolique des patients

(Gellen et al., 2018; Merlet et al., 2019; Vincent et al., 2012). Chez les patients atteints de SCD, plusieurs études ont mesuré certains paramètres pour déterminer de nouvelles informations sur le développement du syndrome métabolique (Babiker & Kaddam, 2018) et il a été rapporté que les patients SCD peuvent développer une résistance à l'insuline entraînant des effets importants sur la glycémie et le profil lipidique. Connaissant le lien possible entre le syndrome **métabolique et la drépanocytose, le second objectif de ce travail a été de tester l'hypothèse selon laquelle l'entraînement en endurance chez les patients SCD améliorerait la pente de la relation $\dot{V}O_2$/puissance et leur flexibilité métabolique.**

L'étude du remodelage musculaire chez les drépanocytaires est une priorité pour améliorer la qualité de vie des patients, par contre mener ces études directement sur l'homme peut poser des problèmes organisationnels, financiers et éthiques. L'utilisation de modèles de souris transgéniques est l'alternative la plus utilisée. Pour pouvoir transposer les observations faites dans ces modèles à l'homme drépanocytaire, les modèles murins drépanocytaires doivent avoir une physiopathologie la plus proche possible de celle observée chez l'homme. La souris Townes est actuellement le modèle de souris qui développe la physiopathologie la plus similaire à celle observée chez les patients drépanocytaires (Ryan et al., 1997; Wu et al., 2006) car celles-ci naissent avec 30 à 50 % d'hémoglobine fœtale (HbF) et présentent de nombreuses similitudes avec les patients drépanocytaires. Cependant, aucune similitude entre le remodelage musculaire présent chez les patients drépanocytaires et le modèle de souris Townes n'a encore été démontrée (Tableau 31). **L'objectif de cette troisième étude était donc de mettre en évidence les similitudes et les différences dans le remodelage du muscle strié squelettique chez les sujets SCT et les patients SCD, et chez les souris Townes SCD et SCT.** L'hypothèse testée est que le remodelage musculaire observé chez l'Homme l'est également chez la souris.

Pour améliorer le profil clinique et la qualité de vie des patients SCD, l'hydroxyurée (HU) est une approche thérapeutique privilégiée et est devenu le principal traitement médicamenteux actuellement utilisé. Ce traitement réveille la synthèse d'hémoglobine fœtale (HbF) ce qui a plusieurs conséquences. D'abord, l'HbF diminue la proportion et le contenu en HbS dans les globules rouges, réduisant ainsi les risques associés à l'HbS. Ensuite, l'HbF a une affinité pour l'oxygène supérieure à l'HbS, ce qui réduit la désoxyhémoglobine. Collectivement, ces deux raisons i) réduisent l'hémolyse, le risque de falciformation et les CVO, ii) améliorent le profil clinique des patients, et iii) augmentent la qualité et l'espérance de vie des patients (Charache et al., 1995; Marahatta & Ware, 2017; Platt, Brambilla, et al., 1994; Wang et al., 2011; Ware et

al., 2004). Cependant, les bénéfices et effets spécifiques de ce traitement, combiné ou non à de l'entraînement en endurance, sur le métabolisme énergétique musculaire restent encore méconnus. Ainsi, **le quatrième objectif était de déterminer l'influence de l'HU sur les caractéristiques microvasculaires, structurales et énergétiques du muscle strié squelettique de souris Townes SCD** testant l'hypothèse que les défauts observés chez les souris sans traitement seraient amoindris chez les souris traitées.

Pour résumer, les différents objectifs de cette thèse sont donc :

1) Etude des caractéristiques microvasculaires, structurales et énergétiques du muscle *vastus lateralis* de sujets féminins et masculins, sains (CON), SCT et SCD,
2) Etude des effets de l'entraînement en endurance chez les patients SCD sur la pente de la relation $\dot{V}O_2$/puissance et leur flexibilité métabolique,
3) Limites du modèle murin dans le remodelage du muscle strié squelettique : étude de physiologie comparée entre humains et souris (modèle Townes) CON, SCT et SCD,
4) Influence de l'HU sur les caractéristiques microvasculaires, structurales et énergétiques du muscle strié squelettique de souris Townes SCD.

ETUDE 1 : Etude des caractéristiques microvasculaires, structurales et énergétiques du muscle *vastus lateralis* de sujets féminins et masculins, sains (CON), SCT et SCD.

Article bientôt soumis et formaté ci-dessous pour une publication dans *Blood*.

Dans cette étude n°1, l'ensemble des analyses ont été réalisées par Marion Ravelojaona pour sa thèse (Ravelojaona, 2015). Les biopsies ont été effectuées à l'occasion de ses premières expérimentations pour les analyses histologiques, les analyses du remodelage microvasculaire, et les analyses des activités enzymatiques. En revanche, les analyses par Western Blot des différents mécanismes impliqués dans la régulation du pH musculaire ont été réalisées dans le cadre de ce projet de thèse, ainsi que l'ensemble des résultats statistiques, conduisant à l'étude des caractéristiques microvasculaires et énergétiques, et comparant les sujets féminins et masculins, sains (CON), SCT et SCD. Léo Blervaque et Laurent Messonnier ont amplement contribué aux traitements et à l'analyse de ces résultats afin de construire la discussion présentée dans l'article de cette étude n°1.

Microvascular and tissular remodeling observed in sickle cell trait and disease include sex and genotype specificities: insights from skeletal muscle

Manon Riccetti[1], Léo Blervaque[1], Marion Ravelojaona[2], Jérémy Delabre[1], Benjamin Chatel[1], Christophe Hourdé[1], Clémence Bexon[1], Cyril Martin[3], Samuel Oyono-Enguéllé[4], Léonard Féasson[2,5], Laurent A. Messonnier[1]

[1]Université Savoie Mont Blanc, Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité, EA 7424, F-73000 Chambéry, France.

[2]Université de Lyon, Université Jean Monnet, Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité, EA 7424, F-42000 Saint-Etienne, France.

[3]Université de Lyon, Université Claude Bernard, Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité, EA 7424, F-42000 Saint-Etienne, France.

[4]Université Yaoundé 1, Faculté de médecine, laboratoire de Physiologie, Yaoundé, Cameroun.

[5]Unité de Myologie, Service de Physiologie Clinique et de l'Exercice, Hôpital Universitaire de Saint-Etienne, F-42000 Saint-Etienne, France.

INTRODUCTION

With approximately five million people affected worldwide, sickle cell disease (SCD) is the most common genetic disease and emerges as a major global public health problem (Piel et al., 2017). SCD is due to a single nucleotide mutation on the β-globin gene (chromosome 11, position 6, codon GAG -> GTG, Glu -> Val), leading to synthesis of abnormal hemoglobin S (HbS). The autosomal recessive mode of transmission leads (depending on the parents' genotype) to descendants either healthy subjects, carriers of sickle cell trait (SCT) or patients with SCD (no, one or two mutated genes, respectively) (Piel et al., 2017; Piel, Patil, et al., 2013; Ware et al., 2017). SCD also includes combination of HbS with other less common variants such as HbC or other hemoglobinopathies such as β–thalassemia Once deoxygenated, HbS may polymerize, rigidifying and distorting the red blood cells, giving them a characteristic sickle shape. The two major clinical manifestations of SCD are hemolytic anemia and vaso-occlusions (VOCs), both contributing to disturb/disrupt oxygen transport and delivery (Nahavandi et al., 2002; Piel et al., 2017; Quinn & Sargent, 2007). A myriad of multifaceted downstream complications and/or pathologies stems from these primary manifestations including acute chest syndrome (ACSs), pulmonary hypertension, heart and vascular dysfunctions and possibly failure of vital organs (Gladwin & Sachdev, 2012). The skeletal muscle is not spared of repercussions. Compared to healthy controls, skeletal muscle of male SCD patients display (Ravelojaona et al., 2015) among others: i) a microvascular remodeling including rarefaction, straightness and enlargement of capillaries, and ii) an impaired capacity of mitochondria to utilize oxygen as characterized by lower activities of oxidative enzymes.

In that context of oxygen supply disorder and utilization deficiency, exercising patients with SCD activate non-oxidative glycolytic pathway and accumulate lactate rapidly (Messonnier et al., 2019). Importantly, blood lactate accumulation is accompanied by acidosis

(Freund et al., 1992), that is critical for patients with SCD. Indeed, acidosis promotes the release of oxygen by hemoglobin (Bohr effect) and therefore potentially triggers the polymerization-sickling cascade (Chatel, Messonnier, et al., 2017). In accordance, almost one third of the VOCs and secondary ACSs are associated with exertion (Bartolucci et al., 2016). Already at rest, 42% of patients present signs of metabolic acidosis (Maurel et al., 2014). Because active muscle is a major source of protons (H^+), it can be hypothesized that patients are subjected to acid/base balance disturbances and adapt their muscle pH regulation mechanisms. However, these mechanisms remain unknown/unexplored to date in patients with SCD.

The risk factor associated with SCT has long been debated but recent studies suggested that more attention should be paid to this heterozygosity. SCT is associated with increased risk for renal, vascular, splenic as well as metabolic diseases (Hulsizer et al., 2022; Jefferson et al., 2021). Furthermore, exhaustive exercise-related complications including rhabdomyolysis and sudden death have for long been documented (S. R. Jones et al., 1970; Kark et al., 1988; Koppes et al., 1977; Nelson et al., 2016; Skinner et al., 2020). Interestingly, carriers of SCT displayed at the skeletal muscle levels capillary density, tortuosity and diameters in between those of healthy controls and SCD patients (Ravelojaona et al., 2015; Vincent et al., 2010). Moreover, the muscle content of monocarboxylate transport 4 (MCT4) involved in muscle pH regulation has recently been shown to be higher in carriers of SCT than in healthy subjects (Messonnier et al., 2022). Hence, the skeletal muscle of carriers with SCT shows also signs of remodeling which deserve to be documented.

Several studies reported sex differences in clinical outcomes in SCD. Complications (like infectious, kidney or cardiovascular diseases), risk factor, rate of pain or crisis and mortality have been reported to be lower in adult or pediatric cohorts of female than male patients with SCD (Baum et al., 1987; Detterich et al., 2019; Gladwin et al., 2004; Olaniran et al., 2019; Pegelow et al., 1997; Platt, Orkin, et al., 1994). Hemoglobinic and hematologic data may partly

account for these sex differences. Female patients may be more anemic than men (Delclaux et al., 2005; Steinberg et al., 1995), meaning that for a given percentage of HbS, women with SCD display a significantly lower total HbS level. Women with SCD also tend to have higher fetal hemoglobin (HbF) proportion (Dover et al., 1992; Kim-Shapiro & Gladwin, 2018; Steinberg et al., 1995) (Kim-Shapiro & Gladwin, 2018)and lesser peripheral oxygen desaturation (Quinn & Ahmad, 2005). All these differences may confer a kind of protection on female patients (Platt, Brambilla, et al., 1994). Besides, nitric oxide (NO) bioavailability and responsiveness to NO are higher in women (due to estrogens) than in men (Gladwin et al., 2003) and these factors are crucial in maintaining vasomotor tone, modulating endothelial adhesion molecule expression (Kim-Shapiro & Gladwin, 2018). Consequently, women with SCD may develop less endothelial dysfunction and blood flow disturbances than their male counterparts (Detterich et al., 2019; Nath et al., 2004). Importantly, NO is also thought to be key in promoting angiogenesis and limiting angiostatin factors (Kim-Shapiro & Gladwin, 2018; Matsunaga et al., 2002; Ziche et al., 1997). Given the role of NO in blood flow regulation/distribution and vascular homeostasis (including angiogenic processes), it can be hypothesized that the skeletal muscle of women with SCD would be less affected/remodeled in their microvascular and energetic domains than their male counterparts. However, no study has investigated to date skeletal muscle microvascular and energetic characteristics of women with SCD.

Therefore, the aim of the present study was to compare skeletal muscle microvascular and energetic characteristics of female and male healthy subjects, carriers of SCT and patients with SCD. Specifically, we hypothesized that the skeletal muscle remodeling observed in men with SCT and SCD is blunted in women.

MATERIALS AND METHODS

Study population

Study population (58 participants) included 18 patients with SCD (9 women and 9 men), 20 carriers of SCT (10 women and 10 men) and 20 healthy controls (10 women and 10 men). Age, height, and weight were 24 ± 4 years, 169 ± 10 cm, and 63 ± 10 kg (means ± SD). The study took place at the Yaoundé General Hospital (Cameroon) and was approved by the local ethics committee (no. 02062007). The experiments were conducted in accordance with the guidelines set by the Declaration of Helsinki for human studies. All subjects were fully informed of the objectives and possible discomfort before giving their written consent. Inclusion criteria are reported in the supplemental.

Inclusion protocol

All prospective subjects underwent thorough physical examination, anthropometric measurements and blood sampling drawn from the antecubital vein of the non-dominant arm at rest. Blood samples were assayed for complete blood count as well as HbS and HbF proportions. Derived parameters were also calculated. Circulating molecules were also assessed (L-, P- and S-selectins, VEGF, MMP2, MMP9). Details are reported in the supplemental.

Muscles biopsies and analyzes

Biopsy of the right *vastus lateralis* muscle was performed percutaneously according to the procedure routinely performed in the laboratory (Féasson et al., 2002) (supplemental). Part of the biopsy sample was mounted in cryomount® (Histolab, Göteborg, Sweden), then frozen in isopentane and finally stored in liquid nitrogen until histochemical and immunohistochemical

115 analyses was performed on 10 µm thick cryostat serial transverse sections. The remainder of
116 the sample was stored in liquid nitrogen and was devoted to biochemical analyses.
117 Based on immunohistochemical analysis (anti-CD31 staining), we analyzed muscle
118 microvascular network indexes including capillary density (CD, number of capillaries per
119 mm^2), number of capillaries in contact with a muscle fibre (CAF), CAF over the fibre surface
120 area (CAFA), the length of capillary over the fibre perimeter ratio (capillary-to-fibre interface),
121 capillary tortuosity (CapTor) and capillary outer diameter and perimeter (COD and COP
122 respectively). The pericyte coverage of skeletal muscle capillaries was assessed based on
123 CD31/NG2 (neural/glial antigen 2) fluorescent co-staining as previously described (Teichert et
124 al., 2017). A third fluorescent staining for α-smooth muscle actin was added to assess pericyte
125 maturity (Ji et al., 2016). Fibre type determination, distribution and morphology (surface area
126 and perimeter), signs of degeneration and regeneration and enzyme activities have also been
127 analysed. Muscle contents of proteins [CAII, CAIII, CAIV, MCT1, MCT2, MCT4, NHE1,
128 NBC (see supplemental for definition), by Western blots] and mRNA [NKFB1, NKFB3, SOD,
129 CAT, GPX3, GPX4 FATCD36, NKFB1, NKFB3, CAT, CPT1 (see supplemental for
130 definition), by RT- qPCR] of interest were assessed. All analyses were performed as previously
131 described (Merlet et al., 2019, 2020; Ravelojaona et al., 2015; Vincent et al., 2010) and/or as
132 reported in the supplemental.
133
134 ***Statistical analysis***
135 Data are presented as Mean (SD). Sex, genotype and crossed effect were assessed with a two-
136 way ANOVA. The normality and homoscedasticity of the residual distribution was tested for
137 each model. In case of significant main effect for genotype or crossed factors, we performed a
138 post-hoc multiple comparisons corrected with false discovery rate method (Benjamini, 2010).

All data were analyzed using Rstudio software (Rstudio, 2021). A p-value <0.05 was considered as significant.

RESULTS

Demography and anthropometry

Age was not different between genotypes. Men were taller and heavier than women. A tendency for a cross effect was also observed for body mass which was lower in men with SCD than in CON while it remained similar between genotypes in women. Body mass index was lower in patients with SCD but no sex or cross effect was observed (Table 1).

Hemoglobin and hematology

As expected, a genotype effect was observed on Hct, Hb, %HbS, MCHC, %HbF and derived parameters (TotHbS, MCHS, MCHCS, TotHbF, MCHF and MCHCF). Women had lower Hct, Hb and HbS proportion than men. A cross effect between sex and genotype was observed for total HbS content and MCHCS both increasing less in women than in men with HbS (Table 1).

Microvasculature and related circulating molecules

A genotype effect was observed on the indexes of the skeletal muscle capillary network density (CD, CAF, CAFA, CapTor and capillary-to-fiber interface) which were lower in SCD than in CON, SCT being in between SCD and CON (Fig. 1A'-C and Suppl. Table 1). A genotype effect was also observed for indexes of capillary size (COD and COP) which were higher in SCD than in CON, SCT being in between SCD and CON (Suppl. Table 1). Women had lower CAF, capillary-to-fiber interface, CapTor, COD, COP than men (Fig. 1A'-C)

regardless of genotype. Interestingly, cross-effects were observed on CD, CAFA and capillary-to-fiber interface, these parameters being more affected in women with HbS than their men counterparts (Fig. 1A'-C and Suppl. Table 1). The cross-effect observed on CapTor is associated with relatively high values of these parameters in healthy (CON) men (Suppl. Table 1). The pericyte coverage of skeletal muscle capillaries did not differ among sex or genotype but women tended to have a lower proportion of $\alpha SMA^{+}/NG2^{+}$ pericytes (Figure 1A', D-E). No differences in skeletal muscle VEFG-A or HIF-1α mRNA expression was noticed among sex or genotype (Figure 1F and Table 4). On the other hand, women presented higher Ang2 protein expression than men regardless of genotype (Figure 1G).

A genotype effect was observed for some circulating soluble adhesion molecules (sL-, sP- and sE-selectins) which were higher as HbS proportion increased (Suppl. Table 2) but not for sICAM and sVCAM. The same genotype effect was found for all the circulating angiogenic factors measured (VEGF, MMP2 and MMP9) excepted PLGF (Suppl. Table 2). Circulating inflammation (IL-8) and oxidative stress (AOPP) markers were significantly elevated in SCD compared to both CON and SCT (Suppl. Table 2). Among these various circulating factors, a significant sex effect was found for L-selectin, IL-8 and PLGF which were higher for L-selectin and IL-8 or lower for PLGF in women (Suppl. Table 2). Finally, significant crossed-effects were observed for AOPP and VEGF, mainly due to sex specific variation in the SCT group (Suppl. Table 2).

Muscle remodeling

To facilitate reading, muscle fibers gathered and presented as type I (types I and I-IIa were pooled) and type II (types IIa, IIa-IIx and IIx were pooled). No significant difference was observed between men and women or between genotypes. However, a crossed effect was observed. Type I were higher in CON women and HbSS men and vice versa for type II. Fiber

surface area was lower in women than in men and was lower in SCD patients. Satellite cell and CD56 positive fibers pools were both higher in men than women and strong cross-effects were observed i.e., while these pools increased in HbSS men, no changes were observed in women (Table 2).

Genotype and sex did not affect PFK and LDH enzymes activity. On the other hand, activities of CK, CS and HAD been significantly lower in SCD patients but not affected by sex (Table 3). mRNA levels of FAT CD36 and CPT1 were higher in women than in men but no effect of genotype was observed (Table 4).

Women displayed higher NF-κB, SOD, CAT and GPX (3 and 4) mRNA levels than their male counterparts without associated genotype effect, nor cross effect. mRNA levels of HIF-1a and REDD1 were not affected by genotype or sex (Table 4).

Myoglobin content was not affected by genotype or sex.

The MCT1, MCT2, NHE1, CAIII, CAIV and NBC contents were not altered by genotype or sex. On the other hand, a genotype, but not sex, effect was observed on MCT4 and CAII contents. Interestingly, this effect was observed on the SCT group which displayed higher MCT4 and CAII content than CON and SCD (Table 3).

DISCUSSION

Microvasculature

Including women in the studied population did not alter the general trend of muscle microvascular remodeling already observed in men with SCT and SCD (Ravelojaona et al. 2015). Thus, genotype altered capillary density (CD), tortuosity (CapTor), functional surface of exchange with muscle fibers (LC/PF), and diameter (COD). More specifically, CD, CapTor, and LC/PF were lower while COD was higher in SCD than in CON, SCT being in between

214 SCD and CON (Fig. 1 and Suppl. Table 1). In that context, it is interesting to note that this
215 genotype-associated microvascular remodeling was accompanied by higher circulating levels
216 of endothelial adhesion markers (sL-, sP-, and sE-selectins) and angiogenic factors (VEGF, IL-
217 8, MMP2, and MMP9) in SCD (Suppl. Table 2). This abundance of circulating angiogenic
218 factors in SCD, confirming previous results (Lopes et al., 2015), is counterintuitive given the
219 rarefaction of muscle capillary network in SCD. A first possible interpretation would be that
220 patients unsuccessfully tend to fight against mechanisms leading to their reduced capillary
221 network. Another possible explanation would be that skeletal muscle microvasculature relies
222 more on myocyte-dependent mechanisms than circulating angiogenic factors (Olfert et al.,
223 2010; Rowe et al., 2014). This latter hypothesis is in accordance with the fact that patients with
224 SCD responded to regular physical activity by muscle angiogenesis inducing capillary growth
225 (Gellen et al., 2018; Merlet et al., 2019). However, the expression of myocyte-derived VEGF-
226 A, the main driver of skeletal muscle angiogenesis (Uchida et al., 2015), was not different
227 between genotypes (Fig. 1). Therefore, capillary rarefaction associated with SCD does not seem
228 to be based on deficient angiogenic stimulation (due to low physical activity for example) but
229 rather on a significant capillary regression. Microvessels obstruction (Reeson et al., 2018)
230 and/or abnormally high pro-capillary regressive oxidative stress (Kanazashi et al., 2013)
231 observed in SCD in the present study (Suppl. Table 2) and elsewhere (Jeney et al., 2002) may
232 at least partially underlie/explain SCD-associated capillary rarefaction.

233 More importantly, the present results also emphasized that women differed from men in
234 several aspects of their microvasculature. Indeed, sex- and cross-effects were observed for CD,
235 CapTor, and LC/PF (Fig. 1 and Suppl. Table 1). These latter results not only indicate that
236 women differ from men, but also that SCD induced particular/specific responses in women.
237 More specifically, the repercussions of SCD on CD and LC/PF were stronger in women than
238 in men. These results are totally opposite to our initial hypothesis which supposed a protective

effect of female sex on muscle microvasculature due to better NO metabolism and bioavailability or protective effect of estrogens against ischemia-reperfusion episodes (Enns & Tiidus, 2010). This sex specificity cannot be explained by the shift of fiber types distribution (*vide infra*) since the crossed effect is still observable in each fiber type (Suppl. Table 1). On the other hand, skeletal muscle angiogenesis and resultant microvasculature being driven by close coordination of various angiogenic factors (Haas & Nwadozi, 2015), several mechanisms might explain this sex specificity. First, the higher capillary rarefaction in women than in men with SCD echoes previous report showing greater impairment of skeletal muscle capillarization with aging in women compared to their male counterparts (N. A. Ryan et al., 2006), which was attributed to the pro-angiogenic effect of testosterone (Horwath et al., 2020). Second, a higher expression of Ang2 was observed in women than in men with SCD while muscle VEGF-A expression was similar in both sexes (Fig. 1). Importantly, an increase of Ang2 without concomitant increase in VEFG-A leads to capillary destabilization and regression (Lobov et al., 2002). The underlying mechanism might be that Ang2 promotes apoptosis of pericytes (Park et al., 2014), which are a key actor of capillary survival (Darland et al., 2003). While the pericyte coverage of capillaries wasn't different among conditions in terms of quantity (Fig. 1D) a trend toward lower proportion of pericytes expressing αSMA was found in women (Fig. 1E). Because αSMA expression characterize fully mature, quiescent and functional pericytes (Ji et al., 2016), the trend for a lower suggest a reduced protective role of pericytes on capillary survival (Song et al., 2005) in women with SCD.

Although several studies argue that women may display lower manifestations and complications related to SCD than their male counterparts (e.g. a lower prevalence for pain, VCO and ACS) (K. F. Baum et al., 1987; Platt et al., 1991), this trend does not seem that clear (e.g., vaso-occlusive episodes, hospitalizations) (Masese et al., 2021). Interestingly, a study investigating the location-specific prevalence of painful crisis showed a significantly higher

prevalence of crisis at the thigh location in women with SCD compared to their male counterparts (McClish et al., 2009). Because blood flow is an important survival factor for capillaries (Lobov et al., 2011), a higher prevalence of painful vaso-occlusive episodes at the thigh level (where the muscle biopsies used in the present study were performed) may also account for the lower microvasculature network observed in women than in men with SCD.

Muscle tissue remodeling

The fact that myoglobin and muscle HIF-1a and REDD1 mRNA levels which can all be altered by chronic hypoxia were not different among groups suggest that the genotype- or sex-associated remodeling of skeletal muscle will discuss below can hardly be attributed to chronic hypoxia. Other mechanisms should be involved.

The different fiber type distribution, fiber surface area and satellite cell count observed in healthy women (CON) compared to their male counterparts are classical results (Glenmark et al., 1992; Walker et al., 2012). However, one important finding of the present study was that genotype and sex crossed effects (or trend for) were observed for fiber type distribution, fiber surface area, satellite cell count and CD56-positive fiber number. More specifically, fiber type distribution shifted toward a higher percentage of type I fibers, and muscle hypotrophy tended to be more important in men with SCD compared to female patients. These first results suggest that skeletal muscle of women with SCD may less suffer than the one of men with SCD. The lower proliferation of satellite cells, which intervene in the regenerative processes, and the lower number of CD56-positive fibers, which indicate fibers under regeneration, further support this inference. Of note, muscle mRNA expression of NF-κB, SOD, CAT, GPX3 and GPX4 were higher in women than in men with SCD. Because oxidative stress induces, via the NF-κB pathway, transcription of genes improving antioxidant defenses (e.g., SOD, CAT, GPXs) (Zhou et al., 2001), the up-regulated mRNA expression of NF-κB, SOD, CAT, GPX3 and GPX4 may

suggest that women might be more subject to muscle oxidative stress than men. On the other hand, the higher SOD, CAT, GPX3 and GPX4 mRNA expression may also suggest that women, including those with SCD might be more prepared to fight against oxidative stress than men. Importantly, oxidative stress due to defects in antioxidant defenses promote muscle atrophy (Muller et al., 2006; Powers & Jackson, 2008). Therefore, one cannot exclude that the lower muscle hypotrophy in women with SCD might be related at least partially to better antioxidant defenses than in their male counterparts.

We observed a higher proportion of satellites cells (SCs) in control men compared to control women (Table 2), as previously described (Horwath et al., 2021; Walker et al., 2012). This sex-difference was exacerbated in SCD patients, with an increase over healthy control occurring only in men with SCD, probably to counteract muscle wasting. Because endothelial cells of capillary maintain close relationships with SCs, being necessary for SCs proliferation (Christov et al., 2007), the larger impairment of capillarization in SCD women (*vide supra*) could explained their failure of SCs mobilization in response to muscle alterations. Consistently, we found a significant positive correlation between the number of satellites cells and capillary-to-fiber surface of interaction (LC/PF).

The lower SCD-associated muscle oxidative capacity (Ravelojaona et al., 2015) as assessed by some mitochondrial enzyme activity (CS and B-HAD) was as depressed in women than in men. Similarly, the effect of genotype on activity of CK (Vincent et al., 2010) which by working concurrently with mitochondria to provide ATP for energy metabolism of contracting muscle cells has a key role in oxidative phosphorylation regulation (Saks et al., 1996) was confirmed in the present study. Together these results suggest that despite divergent muscle microvascular and structural characteristics, the altered metabolic energy metabolism associated with SCD was similar in men and women. Because it cannot be excluded that i) the

314 reported higher NO bioavailability which improves hemodynamics, ii) the higher HbF level
315 which improves, due to its elevated oxygen affinity, oxygen delivery deeper in the tissue due
316 to a higher oxygen affinity, ii) the possible higher antioxidant defenses (*vide supra*), or iii) a
317 combination of these possibilities reported in women with SCD, come to counterbalance their
318 lower capillary density expected to induce a lower muscle oxygen supply and consequently
319 utilization, contributing to maintain their muscle capacity to utilize oxygen similar to men.

320 These weak structural and energetic differences in skeletal muscle between the two
321 sexes do not explain the physiological differences observed between men and women with
322 sickle cell disease (fetal hemoglobin, nitric oxide levels and sex hormones) (Gladwin et al.,
323 2002, 2003; Gladwin & Vichinsky, 2009; Platt et al., 1991, 1994; Reiter et al., 2002) and the
324 repercussions of the disease in their daily lives (vicious circle and sedentary lifestyle). Another
325 suggestion might be anemia because in several studies, it was observed that SCD patients with
326 lower hemoglobin and/or hematocrit levels have less severe and frequent painful crises. A third
327 hypothesis could be related to HbF. It is known that a high HbF level has a protective effect on
328 the disease, with reduced painful episodes, less severe complications (vaso-occlusive crises and
329 acute chest syndrome) and better survival rate (Lande et al., 2017; Mpalampa et al., 2012; Platt,
330 Brambilla, et al., 1994). However, in this study, considering total Hb since women with SCD
331 have a lower Hb level, HbF concentration was similar in men and women. In accordance with
332 our initial hypothesis, a genotype-associated upregulation of muscle pH regulatory mechanisms
333 was observed via increases of muscle CAII and MCT4 content. More interestingly, this is not
334 in SCD but in SCT that this upregulation of muscle CAII and MCT4 content was the more
335 pronounced, SCD being in between SCT and CON. This result is reminiscent of a recent study
336 in another Cameroonian population showing a higher muscle content of MCT4 in SCT carriers
337 (Messonnier et al., 2022). This genotype specificity cannot be attributed to a fiber type shift
338 since i) in healthy context, MCT4 content is rather associated with the non-oxidative glycolytic

fibers (Halestrap & Meredith, 2004; Halestrap & Price, 1999; Pilegaard et al., 1999) while in men with SCT, proportion of type I fibers was similar to CON, and ii) men and women with SCT and SCD were similar in term of muscle MCT4 and CAII content while they were different in terms of fiber type distribution. Similarly, while MCT4 content has been reported to be associated with muscle hypoxia (Ullah et al., 2006), the seemingly lack of chronic hypoxia (*vide supra*) may hardly explain this specific adaptation. As a whole, the present results do not allow to determine the underlying mechanism/pathway that causes this upregulation, however, the HbS genotypes-associated upregulation of CAII is of paramount importance: CAII enhances the activity (even without change in their muscle content) of MCT1 (Becker et al., 2005; Becker & Deitmer, 2008), MCT4 (Becker et al., 2010), NHE1 (Li et al., 2002, 2006) and NBC (Becker & Deitmer, 2007; Loiselle et al., 2004; Pushkin et al., 2004), improving intracellular pH regulatory mechanisms. The CAII-concomitant increase of MCT4 content is also important. In a previous cell culture study, Becker et al. (2010) reported that CAII and MCT4 work concurrently for a lactate/H^+ co-transport into the cell, even at low extracellular concentrations. If such a mechanism also occurs *in vivo* in skeletal muscle, the entry of proton via MCT4 inside muscle cells may greatly contribute to regulate extracellular/blood acidosis. Interestingly, it has been shown that 42% of patients displayed metabolic acidosis at baseline (Maurel et al., 2014). This help in the management of blood acidosis is physiologically and clinically extremely important because by Bohr effect, acidosis decreases the affinity of hemoglobin for oxygen, releasing it early in the microvasculature. Once deoxygenated, HbS may polymerize and trigger the sickling cascade.

Limitations and perspectives

If 58 is a number of participants quite elevated for a relatively invasive study, the stratification by genotypes and sex led to a relatively limited number of subjects per group. Of course, this may reduce the possibility to observe differences between groups and the

impact/significance of the results, however, several genotype, sex and crossed effects have been observed and these results are of interest. In the present study, possible underlying mechanisms to explain the observed differences have been suggested. If the arguments make sense, further studies are warranted to specifically determine these underlying mechanisms.

CONCLUSION

The overall HbS-associated (genotype) effect on muscle microvasculature, atrophy, and energetic characteristics observed previously in men was also found in women. However, women displayed further specific microvascular remodeling since capillary density (CD) and functional exchange surface between capillaries and fibers (LC/PF) were even more affected in women with SCD than in their male counterparts. In addition, SCD induces divergent alterations of muscle fiber type distribution between men and women, and men with tended to have a higher muscle hypotrophy than women with SCD. Finally, a HbS-associated (genotype) effect was observed on parameters involved in pH regulation.

Tables legends

Table 1. Characteristics of SCD patients and hematological data.

Table 2. Data of structural remodeling in SCD patients.

Table 3. Data of muscular activities in SCD patients.

Table 4. Data of mRNA expression in SCD patients.

Figure legends

Figure 1. Analysis of skeletal muscle capillarization indexes and determinants among sex for sickle cell patients and control subjects. A-A'. Representative micrograph of skeletal muscle cryosections stained for CD31 (endothelial cells), NG2 and αSMA (both for pericytes). A. Focus on a single skeletal muscle capillary with splitted channels. Scalebar: 10µm. A'. Large view of muscle cryosections for each condition. Scalebar: 100µm. B-G. Comparison of skeletal muscle capillarization indexes and determinants between genotype and sex (white bar: Female, gray bar: Male). Genotype*Sex and Sex effects were obtained with 2-way ANOVA analysis. Post-hoc analysis: * $p<0.05$, *** $p<0.001$ Different from iso-gender CON; # $p<0.05$; ### $p<0.001$ Different from Female at iso-genotype.

Figure 2. Protein expression of skeletal muscle lactate and pH regulation systems. A-B. Images of representative Western Blot for carbonic anhydrase II (CAII, A) and monocarboxylate transporter 4 (MCT4, B) in CON, SCT and SCD groups. C-D. Muscle content of CAII (C) and MCT4 (D) among genotypes (white bar : Female, gray bar : Male). Genotype effects presented on the graphs were obtained with 2-way ANOVA analysis. Post-hoc analysis: * $p<0.01$ Different from CON (main genotype effect); # $p<0.01$ Different from SCD (main genotype effect).

409 **Table 1.** Characteristics of SCD patients and hematological data.

	W_CON (N=10)	W_SCT (N=10)	W_SCD (N=9)	M_CON (N=10)	M_SCT (N=10)	M_SCD (N=9)	Genotype	Sex	Crossed
	Anthropometric and physiological characteristics								
Age (years)	21.80 (1.40)	22.30 (2.71)	25.11 (5.90)	25.50 (2.76)	23.56 (3.00)	25.13 (5.72)	NS	NS	NS
Height (cm)	163.50 (7.71)	158.40 (6.79)	166.44 (11.65)	176.40 (5.70)	174.67 (5.36)	173.33 (7.73)	NS	< 0.001	NS
Body mass (Kg)	57.70 (8.12)	58.30 (6.65)	60.67 (11.27)	72.70 (6.60)	67.00 (5.34)	62.33 (10.50)	NS	< 0.001	0.06
BMI (Kg/m^2)	23.00 (3.26)	23.19 (1.83)	21.83 (2.66)	23.14 (1.96)	21.86 (1.30)	20.10 (2.27)	0.062	NS	NS
	Hemoglobin and hematological data								
Hct (%)	34.6 (2.84)	34.5 (2.24)	20.7 (3.50)	41.1 (2.43)	39.8 (1.66)	23.3 (3.71)	$< 0.001^{£\$}$	< 0.001	-
Hb (g/dl)	11.6 (1.33)	11.6 (0.70)	7.2 (1.31)	14.1 (1.00)	13.4 (0.80)	8.4 (1.41)	$< 0.001^{£\$}$	< 0.001	-
HbA1 (%)	77.9 (3.05)	49.4 (2.78)	2 (0.24)	80 (2.47)	52.6 (4.82)	0 (0)	$< 0.001^{£\§\$}$	< 0.001	-
HbA2 (%)	2 (0.135)	4.3 (0.72)	7.4 (2.62)	2.1 (0.155)	4.5 (0.97)	7.4 (1.72)	$<0.001^{£\§\$}$	NS	-
HbS (%)	0 (0)	33.6 (2.68)	78.2 (4.06)	0 (0)	31.7 (5.97)	80.9 (5.37)	$<0.001^{£\§\$}$	NS	-
MCH (pg)	25.6 (2.15)	25.5 (2.08)	28.3 (4.98)	26.6 (2.50)	24 (3.76)	28.3 (3.61)	$0.034^{\$}$	NS	NS
MCHC (mg/L)	33.5 (1)	33.8 (0.97)	34.6 (2.05)	34.4 (0.94)	33.8 (1.19)	35.7 (1.11)	NS	NS	NS
MCV (f/L)	76.4 (4.92)	75.3 (4.6)	81.7 (13.12)	77.3 (5.76)	71 (11)	78.1 (12.77)	0.079	NS	NS
HbS Tot (%)	0 (0)	3.9 (0.35)	5.6 (0.90)	0 (0)	4.2 (0.1)	6.8 (1.19)	$< 0.001^{£\§\$}$	< 0.01	-
MCHS (pg)	0 (0)	8.6 (1.2)	22.1 (3.56)	0 (0)	7.7 (2.66)	23 (3.2)	$< 0.001^{£\§\$}$	NS	-
MCHCS (mg/L)	0 (0)	11.4 (1.15)	27 (1.56)	0 (0)	10.5 (2.18)	29 (2.88)	$< 0.001^{£\§\$}$	NS	-
HbF (%)	0.5 (0)	0.4 (0.5)	7.6 (4.94)	0 (0)	0.1 (0.25)	4.7 (3.55)	$< 0.001^{£\$}$	NS	-
HbF Tot (%)	0 (0)	0 (0.06)	0.6 (0.42)	0 (0)	0 (0.04)	0.4 (0.32)	$< 0.001^{£\$}$	NS	-
MCHF (pg)	0.1 (0)	0.1 (0.13)	2.3 (1.51)	0 (0)	0 (0.09)	1.3 (1.16)	$< 0.001^{£\$}$	NS	-
MCHCF (mg/L)	0.2 (0)	0.1 (0.17)	2.7 (1.78)	0 (0)	0 (0.11)	1.5 (1.27)	$< 0.001^{£\$}$	NS	-

410

411 Hct, hematocrit (%); Hb, hemoglobin (g/gl); MCH, mean corpuscular hemoglobin content (pg);
412 MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration (mg/L); MCV, Mean Corpuscular
413 Volume (f/L); NS, not significant. Values are mean ± SE. W: women, M: men. Genotype effect
414 post-hoc analysis: [£]: CON vs SCD, [$]: SCD vs SCT, [§]: CON vs SCT. Crossed effect post-hoc
415 analysis: [a,b,c,d]. Do not sharing similar letter indicated significant difference ($p<0.05$). An
416 absence of value in the crossed effect column indicated the used of non-parametric Kruskal-
417 Wallis test.

Table 2. Data of structural remodeling in SCD patients.

	W_CON (N=10)	W_SCT (N=10)	W_SCD (N=9)	M_CON (N=10)	M_SCT (N=10)	M_SCD (N=7)	Genotype	Sex	Crossed
Structural remodeling									
% Distribution type of fibers									
% Type I	42.6^{ab} (7.8)	32.7^{abc} (11.7)	33.3^{bc} (5.52)	34.1^{c} (4.7)	34.5^{bc} (8.03)	45.2^{a} (11.6)	0.056	NS	< 0.01
% Type IIa	46.9^{bc} (13.35)	56.5^{ab} (9.8)	52.2^{abc} (7.83)	58.6^{a} (8.28)	54.4^{ab} (10.3)	41.7^{c} (9.7)	0.059	NS	< 0.01
% Type IIx	10.5 (7.70)	10.9 (8.92)	14.5 (8.12)	7.2 (6.79)	11.1 (8.83)	14.7 (11.63)	NS	NS	NS
Surface of type of fibers									
Surface for 100 myocytes (µm²)	355738 (81172)	330490 (39476)	298320 (56689)	467077 (76778)	460669 (95270)	319794 (77397)	<0.001$^{£\$}$	<0.001	0.085
Type I mean surface (µm²)	4201 (1023)	4046 (356)	3730 (947)	4917 (679)	4429 (1106)	3175 (1042)	< 0.01$^{£\$}$	NS	NS
Type IIa mean surface (µm²)	2787 (647)	2583 (627)	2113 (453)	3900 (1010)	4249 (1054)	2916 (656)	< 0.01$^{£\$}$	< 0.001	NS
Type IIx mean surface (µm²)	2214 (785)	2697 (939)	2433 (451)	3825 (1500)	3924 (1303)	2957 (645)	NS	< 0.001	NS
Muscle degeneration and regeneration indexes									
Satellite Cells (%myocytes)	0.77^{d} (0.36)	1.45^{d} (0.47)	1.35^{d} (0.56)	3.27^{c} (1.46)	5.21^{b} (1.39)	7.49^{a} (0.58)	< 0.01$^{£§}$	< 0.01	< 0.001
CD56+ Fibers (%myocytes)	0.52^{b} (0.58)	0.41^{b} (0.36)	0.20^{b} (0.19)	1.62^{b} (2.54)	1.28^{b} (1.25)	4.34^{a} (3.57)	NS	< 0.001	0.048

Values are mean ± SE. W: women, M: men. Genotype effect post-hoc analysis: $^{£}$: CON vs SCD, $^{\$}$: SCD vs SCT, §: CON vs SCT. Crossed effect post-hoc analysis: ^{a,b,c,d}. Do not sharing similar letter indicated significant difference ($p<0.05$).

Table 3. Data of muscular activities in SCD patients.

	W_CON (N=10)	W_SCT (N=10)	W_SCD (N=9)	M_CON (N=10)	M_SCT (N=10)	M_SCD (N=9)	Genotype	Sex	Crossed
Oxygen									
MYO	1.00 (0.16)	1.01 (0.42)	0.87 (0.40)	1.01 (0.17)	1.11 (0.47)	1.11 (0.66)	NS	NS	NS
Enzyme activities									
CK	1.85 (145.86)	1.70 (245.71)	1.61 (210.27)	1.82 (114.50)	1.77 (158.11)	1.54 (234.79)	$< 0.001^{£\$}$	NS	NS
PFK	291.46 (41.08)	303.35 (39.10)	326.43 (39.48)	285.18 (30.41)	305.96 (42.81)	304.84 (29.28)	NS	NS	NS
LDH	881.91 (127.96)	831.76 (110.21)	810.83 (126.37)	852.24 (131.33)	897.45 (139.56)	788.66 (105.56)	NS	NS	NS
HAD	16.40 (1.66)	15.40 (3.99)	13.07 (1.72)	17.63 (3.26)	14.96 (2.25)	12.10 (1.75)	$< 0.001^{£\$\S}$	NS	NS
CS	19.88 (2.48)	19.11 (3.62)	15.46 (2.33)	20.71 (3.32)	20.56 (2.47)	14.00 (1.83)	$< 0.001^{£\$}$	NS	NS
COX Type I	175.27 (10.24)	181.32 (12.04)	173.50 (8.53)	178.82 (9.36)	182.53 (6.75)	180.84 (10.62)	NS	NS	NS
COX Type IIa	140.46 (10.49)	146.50 (11.15)	142.64 (10.60)	156.74 (9.23)	154.85 (11.60)	144.81 (7.48)	NS	0.004	NS
COX Type IIx	130.94 (8.66)	127.72 (7.74)	125.84 (9.26)	133.78 (10.74)	123.34 (12.04)	118.70 (8.39)	$0.02^{£}$	NS	NS
pH regulatory mechanisms									
CAII	1.02 (0.32)	1.66 (1.14)	1.66 (1.14)	0.98 (0.25)	2.24 (1.35)	1.21 (0.82)	$0.005^{\$\S}$	NS	NS
CAIII	1.00 (0.34)	1.23 (0.87)	0.82 (0.46)	1.03 (0.36)	1.05 (0.81)	1.11 (0.69)	NS	NS	NS
CAIV	0.98 (0.08)	0.78 (0.31)	1.07 (0.63)	1.02 (0.20)	0.83 (0.32)	0.86 (0.30)	NS	NS	NS
MCT1	0.94 (0.37)	0.94 (0.37)	0.85 (0.53)	1.04 (0.20)	1.00 (0.41)	1.08 (0.29)	NS	NS	NS
MCT2	0.95 (0.20)	0.98 (0.64)	1.13 (0.55)	1.05 (0.36)	1.31 (0.71)	1.13 (1.07)	NS	NS	NS
MCT4	1.05 (0.19)	2.00 (1.36)	1.39 (0.74)	0.95 (0.21)	1.60 (1.11)	1.56 (0.90)	$0.02^{\S}$	NS	NS
NHE1	0.99 (0.08)	0.77 (0.40)	0.90 (0.72)	1.02 (0.11)	1.40 (0.55)	1.09 (0.35)	NS	0.02	NS
NBC	0.95 (0.14)	0.95 (0.41)	0.99 (0.93)	1.04 (0.37)	1.10 (0.44)	0.77 (0.55)	NS	NS	NS

Values are mean ± SE. W: women, M: men. Genotype effect post-hoc analysis: $^{£}$: CON vs SCD, $^{\$}$: SCD vs SCT, §: CON vs SCT.

Table 4. Data of mRNA expression in SCD patients.

	W_CON (N=10)	W_SCT (N=10)	W_SCD (N=9)	M_CON (N=10)	M_SCT (N=10)	M_SCD (N=9)	Genotype	Sex	Crossed
SOD	0.589 (0.050)	0.594 (0.086)	0.531 (0.042)	0.409 (0.098)	0.466 (0.104)	0.445 (0.164)	NS	< 0.001	NS
NF-κB 1	0.366 (0.128)	0.380 (0.182)	0.283 (0.061)	0.213 (0.064)	0.248 (0.070)	0.284 (0.066)	NS	0.005	0.092
NF-κB 3	0.442 (0.092)	0.447 (0.111)	0.426 (0.086)	0.349 (0.126)	0.358 (0.143)	0.413 (0.099)	NS	0.063	NS
CAT	0.385 (0.138)	0.364 (0.131)	0.295 (0.080)	0.260 (0.074)	0.243 (0.075)	0.268 (0.077)	NS	0.006	NS
GPX3	0.488 (0.153)	0.378 (0.085)	0.393 (0.152)	0.329 (0.089)	0.340 (0.113)	0.302 (0.093)	NS	0.011	NS
GPX4	0.622 (0.097)	0.641 (0.128)	0.661 (0.090)	0.507 (0.088)	0.552 (0.108)	0.501 (0.072)	NS	< 0.001	NS
FAT CD36	0.490 (0.133)	0.362 (0.227)	0.336 (0.130)	0.257 (0.084)	0.228 (0.090)	0.261 (0.180)	NS	0.002	NS
REDD1	0.276 (0.190)	0.441 (1.006)	0.175 (0.206)	0.231 (0.406)	0.051 (0.038)	0.195 (0.138)	NS	NS	NS
CPT1	0.350 (0.142)	0.325 (0.080)	0.274 (0.057)	0.243 (0.100)	0.229 (0.060)	0.260 (0.055)	NS	0.01	NS
HIF1a	0.514 (0.197)	0.474 (0.104)	0.506 (0.072)	0.414 (0.083)	0.472 (0.204)	0.445 (0.118)	NS	NS	NS

Values are mean ± SE. W: women, M: men.

Genotype effect post-hoc analysis: $^{£}$: CON vs SCD, $^{\$}$: SCD vs SCT, §: CON vs SCT.

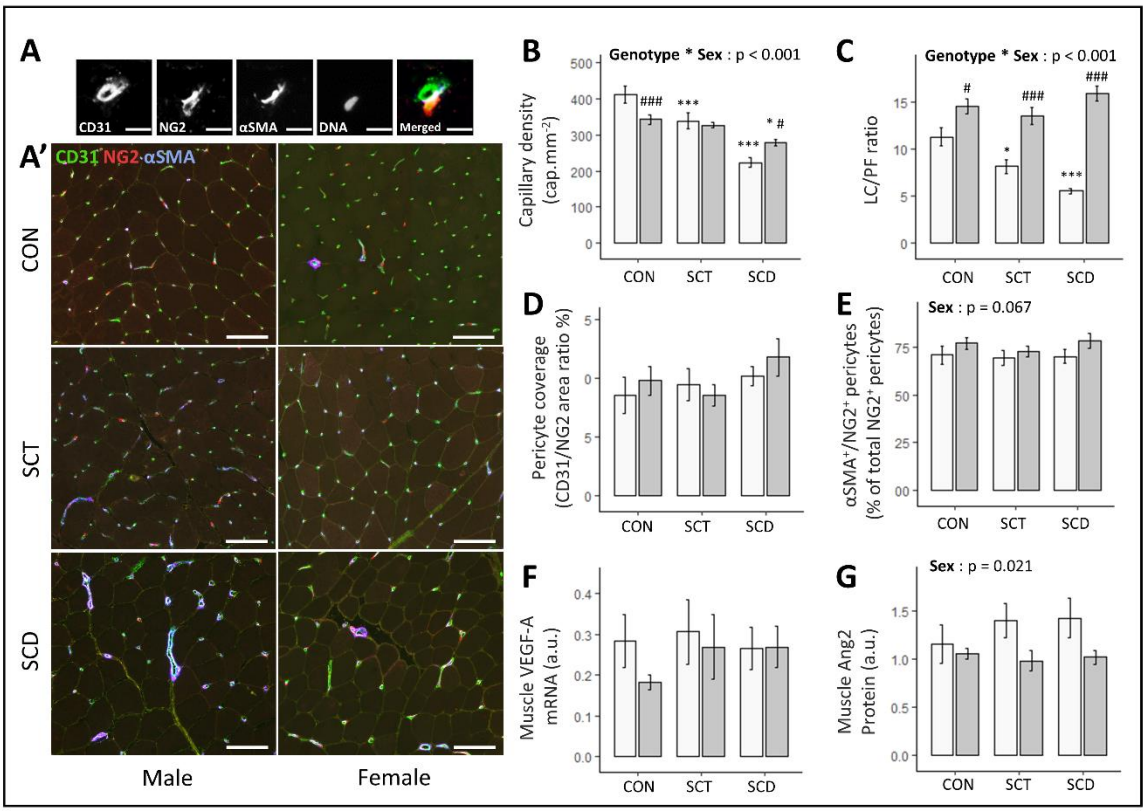
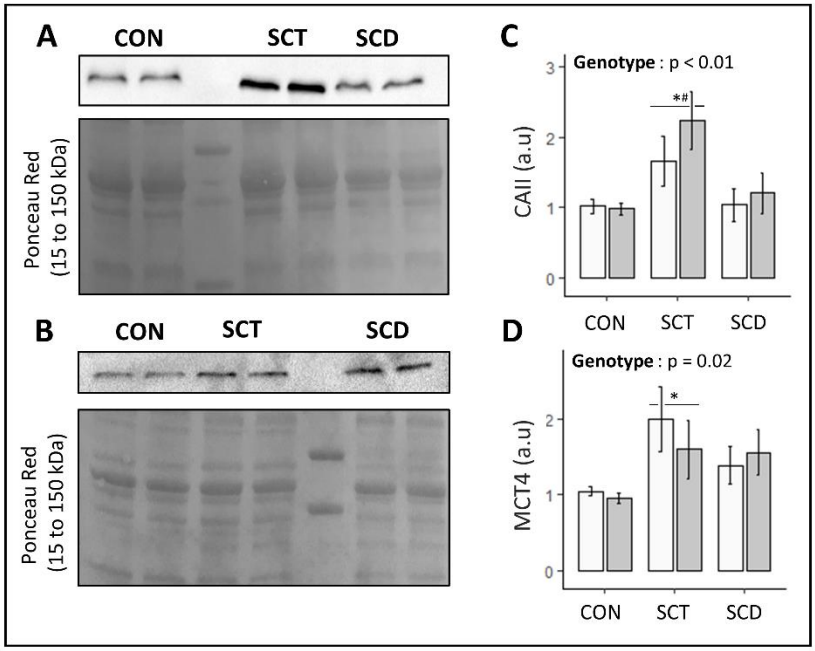


Figure 1. *Analysis of skeletal muscle capillarization indexes and determinants among sex for sickle cell patients and control subjects.* **A-A'.** Representative micrograph of skeletal muscle cryosections stained for CD31 (endothelial cells), NG2 and αSMA (both for pericytes). **A.** Focus on a single skeletal muscle capillary with splitted channels. Scalebar: 10µm. **A'.** Large view of muscle cryosections for each condition. Scalebar: 100µm. **B-G.** Comparison of skeletal muscle capillarization indexes and determinants between genotype and sex (white bar: Female, gray bar: Male). Genotype*Sex and Sex effects were obtained with 2-way ANOVA analysis. Post-hoc analysis: * p<0.05, *** p<0.001 Different from iso-gender CON; $^{\#}$ p<0.05; $^{\#\#\#}$ p<0.001 Different from Female at iso-genotype.



440

441 **Figure 2.** *Protein expression of skeletal muscle lactate and pH regulation systems.* A-B.
442 Images of representative Western Blot for carbonic anhydrase II (CAII, A) and
443 monocarboxylate transporter 4 (MCT4, B) in CON, SCT and SCD groups. C-D. Muscle content
444 of CAII (C) and MCT4 (D) among genotypes (white bar : Female, gray bar : Male). Genotype
445 effects presented on the graphs were obtained with 2-way ANOVA analysis. Post-hoc analysis:
446 * $p<0.01$ Different from CON (main genotype effect); # $p<0.01$ Different from SCD (main
447 genotype effect).

ETUDE 2 : Etude des effets de l'entraînement en endurance chez les patients SCD sur la pente de la relation $\dot{V}O_2$/puissance et leur flexibilité métabolique.

Article soumis le 11 Octobre 2022 dans *Medicine & Science in Sports & Exercise* (*MSSE*) et présenté ci-dessous.

***Contexte et objectif de l'étude* n°2.**

Pour cette étude 2, le protocole effectué auprès des patients a été effectué dans la cadre du projet ExDre 1. Les différentes données ont été récupérées afin d'étudier les effets de l'entraînement en endurance chez les patients SCD sur des aspects alors jusqu'ici jamais abordé tels que, la flexibilité métabolique et les différents/variables substrats impliqués (glucides, lipides, CHOox, Lipidox, RER, volume inspiratoire, fréquence cardiaque, durant l'effort et lors de la récupération). Dans le cadre de son stage de Master, Loïs Mougin s'est impliqué dûment dans le traitement et l'analyse des données ainsi que dans la conception de figures et de graphiques.

Endurance training improves O_2 uptake/demand mismatch, metabolic flexibility and recovery in sickle cell disease patients

Manon Riccetti [1], Loïs Mougin [1], Angèle N. Merlet [2,3], Pablo Bartolucci [4,5], Barnabas Gellen [6], Léo Blervaque [1], Thomas Rupp [1], Thomas d'Humières [5,7,8], Frédéric Galactéros [4,5], Chi-An W. Emhoff [1,9], Léonard Féasson [2,3], Laurent A. Messonnier [1]

[1] Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité, Université Savoie Mont Blanc, Chambéry, France.

[2] Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité, Université de Lyon, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, France.

[3] Unité de Myologie, Service de Physiologie Clinique et de l'Exercice, Hôpital Universitaire de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France.

[4] Service de Médecine Interne, Hôpital Henri-Mondor (AP-HP), Université Paris-Est Créteil (UPEC), Créteil, France.

[5] Sickle Cell Referral Center - UMGGR, Plateforme d'expertise Maladies Rares Grand Paris Est, UPEC, FHU SENEC, CHU Henri Mondor APHP, Créteil, France.

[6] Service de Réhabilitation Cardiaque, Hôpital Henri-Mondor (Assistance Publique–Hôpitaux de Paris [APHP]), Créteil, France

[7] Service de Physiologies, FHU SENEC, Hôpital Henri Mondor APHP, Créteil, France.

[8] INSERM IMRB U955, Team 8, Université Paris Est (UPEC), Créteil, France.

[9] Department of Kinesiology, Saint Mary's College of California, Moraga, California, USA

Corresponding author:

25 Laurent A. Messonnier, Université Savoie Mont Blanc, Laboratoire Interuniversitaire de
26 Biologie de la Motricité, F-73376 Le Bourget-du-Lac Cedex, France
27 Email: laurent.messonnier@univ-smb.fr, Phone: +33(0) 4 79 75 81 85
28
29
30 **Abstract word count:** 274
31 **Text word count:** 3678
32 **Number of Tables:** 4
33 **Number of Figures:** 1
34
35 **Key words:** sickle cell anemia, exercise, oxygen consumption, energy metabolism.
36

Abstract

Purpose: Patients with sickle cell disease (SCD) display abnormal responses to exercise suggesting oxygen supply/demand mismatch and poor metabolic flexibility. Because endurance training increases the microvascular network and muscle oxidative enzymes activity including 3-hydoxylacyl-CoA dehydrogenase, a key enzyme involved in lipid oxidation, we hypothesized that endurance training would improve the slope coefficient of the oxygen uptake ($\dot{V}O_2$) *vs.* work rate curve and metabolic flexibility in patients with SCD. We also hypothesized that endurance training would improve post-exercise cardiopulmonary and metabolic recovery in patients. **Methods**: Fifteen patients with homozygous SCD performed a submaximal incremental test on a cycle ergometer before (SIT1) and after (SIT2) 8 weeks of endurance training. Minute ventilation, ventilation rate (VR), heart rate (HR), $\dot{V}O_2$, CO_2 production, respiratory exchange ratio, carbohydrate/lipid utilization and partitioning (thus including %Lipidox), tissular saturation index (TSI), extraction index (HHb) and blood lactate concentration ($[lactate]_b$) were measured during and after SIT1 and SIT2. **Results**: After training, the slope coefficient of the $\dot{V}O_2$ *vs.* work rate curve was significantly higher and the $[lactate]_b$ increase was delayed. During SIT2, TSI remained similar and HHb was lower compared to SIT1, suggesting improved oxygen supply and extraction after training. During SIT1, patients' energy metabolism apparently relied largely on carbohydrate sources. After training, %Lipidox tended to increase at low exercise intensities, blunting the apparent metabolic inflexibility. Post-exercise recovery of VR, HR and $[lactate]_b$ was faster after training. **Conclusions**: Endurance training in patients with SCD i) ameliorated the oxygen supply/demand mismatch, ii) blunted the metabolic inflexibility, and iii) improved some post-exercise cardiopulmonary and metabolic responses. As a whole, the present data reinforce the notion that structured/calibrated endurance training is beneficial for patients with SCD.

Introduction

Sickle cell disease (SCD) is the most common severe genetic disease and hemoglobinopathy in the world (Piel et al., 2017). SCD is caused by a mutation of the gene that encodes for β-globin, leading to the synthesis of an abnormal hemoglobin S (HbS). When deoxygenated, HbS can polymerize, giving the red blood cells (RBCs) a particular sickle shape. Sickle RBCs are i) fragile leading to important hemolytic anemia and ii) rigid and adherent to the endothelium, disturbing hemodynamics, favoring entrapment of sickle RBCs into the microcirculation, and potentially progressing into vaso-occlusion.

These consequences of SCD (hemolytic anemia, endothelial adherence, altered hemodynamics and vaso-occlusion) act in concert with a rarefaction of the microvascular network (Ravelojaona et al., 2015) and an apparent tissular shunt (Detterich et al., 2019) to limit oxygen transport and delivery deep into the tissues. The active skeletal muscle which extensively uses oxygen for its energy metabolism, may particularly suffer from this impeded oxygen supply. Additionally, the muscle remodeling that accompanies SCD includes alterations of oxidative (mitochondrial) enzymes activity (Ravelojaona et al., 2015). Therefore, if skeletal muscle is restricted in oxygen supply, it is also limited in its capacity to consume it (Ravelojaona et al., 2015). As a consequence, SCD patients display poor physical ability as well as particular/abnormal responses to physical activity (Messonnier et al., 2019). A first particular response to exercise is the shape of the $\dot{V}O_2$ *vs.* work rate relationship. Previous studies have shown that the slope of this relationship is lower in young adult (Liem et al., 2009) and adult (Messonnier et al., 2019) patients with SCD than in control subjects. It is unlikely that this lower slope reflects a higher efficiency of movement in patients with SCD. Rather, the lower slope result from the disturbed oxygen delivery and utilization (*vide supra*) demonstrating an oxygen uptake/demand mismatch (Detterich et al., 2019). A second particular

response to exercise is the early and rapid blood lactate accumulation in patients with SCD (Merlet et al., 2020; Messonnier et al., 2019; Miller et al., 1973). If this early blood lactate accumulation signifies involvement of the glycolytic pathway in the energy supply, it also suggests a down-regulation in lipid utilization. Indeed, elevated lactate levels inhibit lipolysis (Issekutz & Miller, 1962) and function of carnitine palmitoyl transferase 1, the transporter of free fatty acids into mitochondria (Goodpaster, 2013; McGarry, 1995). Because metabolic flexibility reflects the ability to oxidize carbohydrate and lipid during exercise (San-Millán & Brooks, 2018), poor metabolic flexibility can be suspected in the context of SCD.

In the past lustrum, studies have investigated the potentially beneficial effects of moderate-intensity endurance-exercise training programs in patients with SCD (Gellen et al., 2018; Grau et al., 2019; Liem et al., 2017; Merlet et al, 2020; Messonnier et al., 2019). At the muscular level, this type of training enlarged the microvascular network and improved the activity of key mitochondrial energetic metabolism enzymes (Ravelojaona et al., 2015; Vincent et al., 2010). Thus, endurance training seems to augment muscle oxygen supply and utilization. Whether these tissular adaptations lead to, or at least coincide with, alterations observable at the integrative level, such as a higher slope coefficient of the $\dot{V}O_2$ *vs.* work rate relationship, remains unknown. Furthermore, the well-documented blunting effect of endurance training on blood lactate concentrations in healthy subjects (Messonnier et al., 2001, 2013) occurs in patients with SCD (Gellen et al., 2018; Merlet et al., 2019, 2020), suggesting that the lactate-related inhibition on lipolysis and free fatty acid entry in mitochondria may also be partially blunted. In that context, it is interesting to note that endurance training in patients with SCD increased the activity of 3-hydoxylacyl-CoA dehydrogenase, a key enzyme involved in β-oxidation (Merlet et al., 2020). Together, these latter results suggest a potential for increased lipid oxidation after endurance training in SCD, consequently improving metabolic flexibility.

Endurance training improves post-exercise physiological adaptations by accelerating the return to basal values in healthy subjects. These faster returns to baseline values are observable on cardio-respiratory parameters such as heart rate, minute ventilation and $\dot{V}O_2$, as well as on metabolic responses like blood lactate concentrations (Frey et al., 1993; Hagberg et al., 1980; Messonnier et al., 2001). For the cardio-respiratory parameters, these adaptations are particularly observable in the first part of the recovery (Coote, 2010; Hagberg et al., 1980). However, whether similar post-training observations are present in patients with SCD has yet to be investigated.

Therefore, the aim of the present study was to test the hypotheses that in patients with SCD, endurance training would improve i) the oxygen uptake/demand matching increasing the slope coefficient of the $\dot{V}O_2$ *vs.* work rate curve, ii) metabolic flexibility, and iii) their post-exercise cardiopulmonary responses.

Methods

Study Population

Fifteen adult patients with homozygous SCD [7 women (2 took hydroxyurea) and 8 men (7 took hydroxyurea)] without severe chronic complications participated in this study which took place in the Referral Center for Major Sickle Cell Syndrome in Créteil, France. They received no transfusion during the whole duration of the study, nor were they hospitalized for vaso-occlusive crisis. No folate deficiency was detected. The study was approved by the ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Est 1 2014-14; EudraCT ID RCB 2014-A00334-43), in accordance with the Declaration of Helsinki (www.clinicaltrials.gov #NCT02571088). Part of the results have been previously published for other purpose (Gellen

et al., 2018; Merlet et al., 2020). When necessary, they are repeated here for convenience of the readers.

Study design

Patients performed the same submaximal incremental exercise test on a cycle ergometer before (SIT1) and after (SIT2) an 8-week endurance training program.

Submaximal incremental exercise test

The exercise test was performed on an electronic cycle ergometer (Ketler, Ense-Parsit, Germany). Exercise started at 20 W for women or 30 W for men and increased stepwise every 2 min by 10 or 15 W for women or men, respectively. Gas exchange measurements [including ventilation rate (VR, cycle·min^{-1}), minute ventilation ($\dot{V}E$, L·min^{-1}), $\dot{V}O_2$ (L·min^{-1}) and carbon dioxide production ($\dot{V}CO_2$, L·min^{-1})] and heart rate (HR, beats·min^{-1}) were continuously recorded. Every minute, whole blood lactate concentration ([lactate]$_b$, mmol·L^{-1}) was assessed via a blood drop taken from the earlobe and analyzed extemporaneously (Lactate Scout, EKF diagnostics, Cardiff, UK). Exercise terminated as soon as a [lactate]$_b \geq 4$ mmol·L^{-1} was recorded (Gellen et al., 2018; Messonnier et al., 2019). The test was followed by 2 min of active recovery at 20 or 30 W for women or men respectively, and thereafter by at least 6 min of passive recovery. The recovery and patient observation period ended when experimenters observed both i) a clear decrease in [lactate]$_b$ and ii) a value of [lactate]$_b$ below 4 mmol·L^{-1}. This session was used to determine i) the $\dot{V}O_2$ *vs.* work rate (W) relationship, ii) energy substrate oxidation and partitioning, iii) cardiopulmonary data during recovery and iv) the initial target exercise intensity for the training sessions. This latter parameter was determined as the work rate corresponding to the first lactate threshold, expecting a [lactate]$_b$ of ~2.5 mmol·L^{-1} during endurance exercise training sessions at this exercise intensity (Messonnier et al., 2019).

Endurance exercise training protocol

Patients completed a moderate-intensity endurance-exercise training period, composed of 24 exercise sessions (3 sessions a week for 8 weeks) on a cycle ergometer. Each training session started with an initial 5-min warm-up (at 70% of the target work rate), continued with a 30-min constant-load endurance exercise at the target exercise intensity, followed by a 5-min cool-down (at 70% of the target work rate), and ended with light stretching. During the training sessions, several parameters were recorded: HR, blood pressure, peripheral oxygen saturation and $[lactate]_b$. Patients were encouraged to drink water regularly for proper hydration. The exercise workload was selected with the goal of reaching a $[lactate]_b$ of ~2.5 $mmol \cdot L^{-1}$. According to the $[lactate]_b$ obtained during each training session, exercise work rate for the subsequent training session was adjusted according to the strategy proposed by Messonnier *et al*. (Messonnier et al., 2019). A physician was present for the clinical observation of patients during each training session.

Gas exchange measurements and analyses

During SIT1 and SIT2, cardiopulmonary parameters (HR, VR, $\dot{V}E$, $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}CO_2$) were continuously measured by an ErgoCard device (Medisoft, Sorinnes, Belgium). Gas exchange measurements allowed for determination of the slope coefficient (a) of the linear $\dot{V}O_2$ *vs.* work rate relationship and the respiratory exchange ratio (RER) according to Eq. 1 and Eq. 2, respectively:

$$\dot{V}O_2 = a \cdot \text{work rate} + b \quad \text{(Eq. 1)}$$

$$RER = \dot{V}CO_2 / \dot{V}O_2 \quad \text{(Eq. 2)}$$

Carbohydrate and lipid oxidation rates were assessed according to previous equations proposed by Frayn (Frayn, 1983) (1983) (Eq. 3 and Eq. 4, respectively):

$$CHOox\ (g \cdot min^{-1}) = 4.55 \cdot \dot{V}CO_2 - 3.21 \cdot \dot{V}O_2 - 2.87 \cdot 0.01 \quad \text{(Eq. 3)}$$

$$Lipidox\ (g \cdot min^{-1}) = 1.67 \cdot \dot{V}O_2 - 1.67 \cdot \dot{V}CO_2 - 1.92 \cdot 0.01 \quad \text{(Eq. 4)}$$

Substrate partitioning via non-protein respiratory quotient (NPRQ) was calculated using equations proposed by Zarins et al. (Zarins et al., 2009).

$$NPRQ\ (\%) = [\dot{V}CO_2 – (0.01 \cdot 4.89)] / [\dot{V}O_2 – (0.01 \cdot 6.04)] \quad \text{(Eq. 5)}$$

$$\%CHOox\ (\%) = [(NPRQ – 0.707) / 0.293] \cdot 100 \quad \text{(Eq. 6)}$$

$$\%Lipidox\ (\%) = (100 - \%CHOox) \quad \text{(Eq. 7)}$$

The last RER value taken into account for CHOox, Lipidox, %CHOox and %Lipidox analyses was the first value ≥ 1.0 but lower than 1.05 on SIT2 (San-Millán & Brooks, 2018). For RER values ≥ 1.0, Lipidox and %Lipidox were considered to be null.

Near-infrared spectroscopy

Muscle oxygenation was investigated with a portable near-infrared spectroscopy apparatus (Portalite, Artinis Medical Systems, the Netherlands). The probe was affixed to the skin of the lower third of the right *vastus lateralis*, parallel to muscle fibers, in a position normalized to ensure accurate positioning for SIT1 and SIT2. The device was a 2-wavelength continuous wave system, which simultaneously used the modified Beer-Lambert law and spatially resolved spectroscopy method to measure oxy- and deoxy-hemoglobin (HHb) changes from the differences in absorption characteristics of the light (750 and 850 nm) and to compute a tissue saturation index (TSI, %). HHb reflects an index of tissular oxygen extraction while TSI reflects the dynamic balance between O_2 supply and O_2 consumption in the investigated muscle volume.

Recovery data analysis

Different variables (VR, $\dot{V}E$, $\dot{V}O_2$, HR and $[lactate]_b$) were measured and recorded at T0' and T2' of active recovery and at T0', T2', T4' and T6' of passive recovery. Differences between T0' and T2' of active recovery (Δ0-2) and between T0' and T6' of passive recovery (Δ0-6) were considered.

Statistical analysis

Data from rest and the three first stages of SIT1 and SIT2, completed by all patients, were included for statistical analyses performed with Statistica (version 80.0, Statsoft, Tulsa, OK, USA). Values are presented as mean ± standard error. Normality of data distribution was tested and confirmed by the Shapiro–Wilk test. Differences between pre and post training data were performed using a t-test, dependent samples. The level of statistical significance was set at $\alpha = 0.05$.

Results

Patients' baseline characteristics are reported in Table 1.

*** Insert Table 1 ***

Submaximal incremental exercise

Applying Eq. 1 to the experimental data, mean ± SE r^2 value of the $\dot{V}O_2$ *vs.* work rate relationship was 0.9492 ± 0.0598. The slope coefficient of the curve was significantly higher after training ($p = 0.008$) (Figure 1).

*** Insert Figure 1 ***

TSI and HHb were obtained by NIRS every minute during SIT1 and SIT2 (Table 2). TSI remained similar before and after training while HHb increased by 1.6 to 2.6-fold (for low- and high-intensity exercises, respectively) after training (statistical significance was reached only for the two first stages due to a large variability of values during the third stage, especially before training).

*** Insert Table 2***

Table 3 reports values of $[lactate]_b$, gas exchange measurements and substrate utilization and partitioning during SIT1 and SIT2. At rest and at 20/30 W, no training-induced differences were observed for $[lactate]_b$. At 30/45 W and 40/60 W, $[lactate]_b$ was significantly lower after training ($p = 0.005$ and $p = 0.006$, respectively). At rest and all exercise intensities (20/30 W, 30/45 W, and 40/60 W), RER was significantly lower after training ($p = 0.03$, $p = 0.004$, $p = 0.004$ and $p = 0.001$, respectively). Lipidox increased at 30/45 W, while %Lipidox increased and thus %CHOox decreased at 30/45 W and 40/60 W. No training-induced differences were observed at rest and 20/30 W (Table 3).

*** Insert Table 3***

Subsequent recovery

During active and passive recovery (Table 4), no significant changes were observed for $\dot{V}E$, $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}CO_2$. During passive recovery (Δ0-6), VR drop was greater after training ($p = 0.05$).

HR decreased significantly more rapidly during active recovery after training, as shown by i) a lower mean HR after 2 min of active recovery ($p = 0.02$), while HR at exercise completion was similar, ii) a greater post-training Δ0-2 of HR ($p = 0.02$).

After training, $[lactate]_b$ decreased more rapidly during passive recovery (Table 4), as $[lactate]_b$ values at the 4th and 6th minutes of passive recovery were lower after training ($p = 0.05$ and $p = 0.01$, respectively).

*** Insert Table 4 ***

Discussion

In the present study, we hypothesized that endurance training would improve i) the slope coefficient of the $\dot{V}O_2$ *vs.* work rate curve indicating a lower oxygen supply/demand mismatch, ii) metabolic flexibility and iii) post-exercise cardiopulmonary and metabolic responses in patients with SCD. The main findings were that 8 weeks of endurance training in patients with SCD i) increased the slope coefficient of the $\dot{V}O_2$ *vs.* work rate relationship, ii) blunted the metabolic inflexibility and iii) improved post-exercise recovery of some cardiopulmonary and metabolic parameters.

Effects of endurance training on oxygen uptake/demand mismatch and blood lactate accumulation

The slope coefficient of the $\dot{V}O_2$ *vs.* work rate relationship has been reported to be lower in young adult and adult patients with SCD than in control subjects (Messonnier et al., 2019). This lower slope coefficient suggests an oxygen uptake/demand mismatch resulting very likely from a lower muscle oxygen supply (due to anemia, microvasculature rarefaction and low capillary/fiber surface of exchange) and/or low muscle ability to consume oxygen (as testified by the lower oxidative enzymes activity) (Ravelojaona et al., 2015). In accordance with these purported mechanisms, blood lactate levels increased early during incremental exercise in

patients with SCD (Messonnier et al., 2019). This oxygen uptake/demand mismatch at the whole-body level is reminiscent of the oxygen supply/demand mismatch at the cerebral and peripheral (hand and forearm) levels due to lower oxygen extraction and arterialization of venous blood in patients with SCD (Bush et al., 2018; Detterich et al., 2019; Nahavandi et al., 2002).

Because endurance training enlarges the microvasculature, increases the capillary/fiber surface of exchange, and enhances oxidative enzyme activity in SCD (Merlet et al., 2020; Merlet, Messonnier, et al., 2019), we suspected improved oxygen supply and extraction/consumption. The NIRS results obtained in the present study tend to support both improved oxygen supply and peripheral extraction (Table 2). Indeed, HHb, which is an index of peripheral extraction (Ferreira et al., 2005) was 1.6 to 2.6-fold higher after training. This result, combined with the absence of changes in TSI (an index of the balance between oxygen supply and extraction), argue in favor of an improved oxygen supply after training. Consequently, exercise-associated energy metabolism is expected to rely more on oxygen-derived pathways after training (Gollnick & Saltin, 1982). Therefore, we hypothesized that endurance training would reduce the oxygen uptake/demand mismatch by increasing the slope coefficient of the $\dot{V}O_2$ *vs.* work rate curve in patients with SCD. The present results support this hypothesis (Figure 1). This assertion of a training-induced reduction of oxygen supply/demand mismatch via better oxygen supply and consumption also fits with the delayed blood lactate accumulation after training (Table 4).

The improved matching between oxygen uptake and demand is of paramount importance for patients with SCD. Indeed, this adaptation promotes better physical ability allowing patients with SCD to perform more vigorous activities of everyday life (e.g., climbing stairs, holding loads, walking faster) (Merlet, Chatel, et al., 2019). The concomitant delay in blood lactate accumulation is equally significant because it should dampen the risk of triggering the

polymerization/sickling cascade and vaso-occlusion through blunting at least three mechanisms: metabolic acidosis, vasoconstriction, and cell adhesion. Acidosis that accompanies substantial blood lactate accumulation (Freund et al., 1992), triggers the polymerization/sickling cascade via a Bohr effect on the oxyhemoglobin dissociation curve [extensively discussed in previous papers (Chatel, Messonnier, & Bendahan, 2018; Messonnier et al., 2019)]. Thus, risk of acidosis would be reduced when blood lactate concentrations are lower (Figure 2). The lower blood lactate concentrations for a given work rate also suggest lower lactate production through muscle glycogenolysis, which is activated by epinephrine (Febbraio et al., 1998; Richter et al., 1982; Watt et al., 2001), whose circulating concentrations increase with exercise intensity (Messonnier et al., 2013; Suetta et al., 2004) due to progressive sympathetic nervous system activation (Figure 2). Therefore, the lower post-training blood lactate concentrations may be in part due to reduced epinephrine-induced muscle glycogenolysis for a given work rate after training because of a lower sympathetic nervous system activation (Kjaer et al., 1985; Winder et al., 1978, 1979). Of note, sympathetic nervous system activation induces vasoconstriction, and epinephrine activates cell adhesion processes via a cyclic adenosine monophosphate–dependent protein kinase A pathway (Zennadi et al., 2004, 2007), both increasing the risk of hemodynamic disorders and potentially vaso-occlusion (Febbraio et al., 1998; Velusamy et al., 2020; Winder et al., 1978). Therefore, a lower post-training sympathetic nervous system activation would constitute a major beneficial effect of endurance training to dampen hemodynamic disorders and risk of vaso-occlusion observed in exercising-patients with SCD (Bartolucci et al., 2016). Given the potential implication of these mechanisms in the pathophysiology of SCD, further studies investigating the specific effects of endurance training on sympathetic nervous system activation and catecholamine levels are warranted in SCD.

*** Insert Figure 2 ***

Endurance training improves metabolic flexibility

In the present study, RER values were elevated during rest and low exercise intensities. This is not the first time that elevated RER values have been observed in SCD patients (Alsaied et al., 2018; Liem et al., 2009, 2015, 2017). A possible explanation is that patients with SCD are subject to acid/base disturbances, as described by Maurel et al. (Maurel et al., 2014) who reported that 42% of (stable and without renal failure) SCD patients encountered baseline metabolic acidosis. Therefore, although high RER values would apparently indicate no or poor lipid oxidation, one may not exclude that lipid oxidation was partially masked by acid/base disturbances in patients with SCD. In that context of high RER values, several data have been excluded (see methods) to be able to assess substrate utilization and partitioning, and their interpretation should be taken with caution (*vide supra*).

Nevertheless, in the aggregate, the present results (RER values, %CHOox and %Lipidox, Table 3) suggest a high dependence from glycolytic sources in the energy supply at rest and during exercise in patients with SCD. In accordance, we have previously shown that skeletal muscle of patients with SCD have similar glycolytic but lower β-oxidation enzymes activities than control counterparts (Ravelojaona et al., 2015). By extension, the present results suggest an apparent metabolic inflexibility (San-Millán & Brooks, 2018) in patients with SCD.

Given the link between capillary density and glucose uptake (Lillioja et al., 1987) and the fact that patients with SCD have lower capillary density (Ravelojaona et al., 2015) as well as the links between insulin, hemodynamics and glucose uptake (Baron, 1994) and the observed hemodynamic disturbances in patients with SCD (Detterich et al., 2019; Nath et al., 2004), one may expect insulin resistance and lower glucose uptake in patients with SCD. Contrary to this hypothesis, insulin resistance and glucose uptake do not differ between SCD patients and control subjects (Ter Maaten et al., 2001). Other studies even found lower insulin resistance

(Yavropoulou et al., 2017) and higher insulin sensitivity (Akinlade et al., 2018) in SCD patients than in control subjects. From that point of view, the present results (elevated RER and %CHOox) also suggest that glucose uptake and its subsequent utilization by the skeletal muscle are not dampened in patients with SCD. This latter inference is also in accordance with the lower fasting blood glucose observed by Babiker et al. (Babiker & Kaddam, 2018). Further studies would be necessary to characterize the relationship between this elevated glucose utilization and risk of metabolic syndrome in SCD; however, the prevalence of metabolic syndrome in sickle cell anemia patients has been reported to be approximately half of that in African-American counterparts (Ogunsile et al., 2019). Patients with SCD also seem to be less likely to develop obesity and diabetes mellitus compared to their peers (Jang et al., 2021).

In healthy subjects, endurance training decreases carbohydrate utilization (glycogen and glucose) and increases lipid utilization for low-intensity exercises (Brooks & Mercier, 1994; Jeukendrup et al., 1997; Kiens et al., 1993). The trends towards lower post-training values of RER, CHOox and %CHOox along with higher Lipidox and %Lipidox during low-intensity exercise suggest that endurance training acts to some extent similarly in patients with SCD as in healthy subjects by improving metabolic flexibility. This training-induced beneficial adaptation is supported by the concomitant increase in activity of 3-hydoxylacyl-CoA dehydrogenase (a key enzyme involved in β-oxidation) in patients with SCD (Merlet et al., 2020). Of note, while endurance training appeared to improve metabolic flexibility in patients with SCD, the adaptations remained relatively modest. Further studies are necessary to determine the extent of benefits of a long-term endurance training program on substrate oxidation and partitioning in patients with SCD.

Post-exercise recovery

During active recovery, VR decreased faster while $\dot{V}E$ decreased similarly after training. This result may suggest a better ventilatory efficiency after training. In this study, the $\dot{V}O_2$ decline was not different before and after training. This lack of difference is not surprising given the contrasting results reported in the literature (Short & Sedlock, 1997). On the other hand, HR decline was faster after training. According to Coote (Coote, 2010), this adaptation in HR decline could be attributed to increased vagal activity after training. Of note, vagal activity is believed to be a reliable index of the general health status of a subject (Buchheit et al., 2004), suggesting benefits gained by endurance training. However, since our observation took place during active recovery, we cannot exclude a possible role of lower post-training sympathetic activation. According to the Fick's principle [$\dot{V}O_2$ = (stroke volume · HR) · extraction], the similar $\dot{V}O_2$ and faster HR declines during recovery may indicate higher extraction, higher stroke volume or a combination of the two. The higher post-training oxygen extraction has already been largely discussed in the present study. The faster blood lactate decline during passive recovery is also in accordance with previous studies in healthy subjects (Messonnier et al., 2001). As a whole, similar benefits of endurance training can be observed during post-exercise recovery in patients with SCD and in healthy subjects.

Limitations

We observed elevated RER values during rest and low-intensity exercise. As mentioned before, this is not the first time that elevated RER values are reported in SCD patients (Alsaied et al., 2018; Liem et al., 2009, 2015, 2017). To ensure validity of gas exchange measurements, the metabolic cart underwent standard service before the study, as well as calibration before each session. Additionally, the experiments took place over 18 months, during which time values remained similar. However, we are aware that because of high RER values, the number of available data to assess substrate partitioning and utilization was limited and that their

406 interpretation should be taken with caution. Further studies including a larger number of
407 patients and a longer training period should allow a more precise assessment of the metabolic
408 flexibility and the benefits of endurance training. In a long term therapeutic perspective, it
409 seems probable that acute VOC may compromise the benefits of training.
410
411 ***Conclusions***
412 The main findings of the present study were that 8 weeks of endurance training in patients
413 with SCD i) increased the slope coefficient of the $\dot{V}O_2$ *vs.* work rate relationship indicating a
414 decrease of the oxygen supply/demand mismatch, ii) blunted the metabolic inflexibility, though
415 these adaptations are modest and should be taken with caution in the present study and iii)
416 improved some post-exercise cardio-metabolic responses as in the general population. As a
417 whole, the present data reinforce the idea that endurance training is beneficial for patients with
418 SCD.
419
420
421 **Acknowledgements:** This study is part of a larger experiment. Part of the results presented here
422 have been submitted for publication elsewhere for other purpose (Gellen et al., 2018; Merlet et
423 al., 2019; Merlet et al., 2020).
424
425
426 **Credits:** The Authors would like to thank all the patients for their interest and voluntary
427 participation in the study.
428
429

Authors' contribution: PB, BG, FG, LF and LAM designed the study. AM, PB, BG, TR, FG, LF and LAM performed the experiments and recorded the data. MR, LM, AM, TR, LB and LAM analyzed and interpreted the data. MR and LAM wrote the first draft. All authors critically revised and approved the present version of the manuscript.

Conflicts of interest and disclosures

The authors declare no conflict of interest or financial interests. The results of the study are presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification, or inappropriate data manipulation.

Tables legends

Table 1. Baseline characteristics of patients.

Table 2. Values of Tissular Saturation Index (TSI) and deoxyhemoglobin (HHb) during the submaximal incremental tests 1 (SIT1) and SIT2.

Table 3. Blood lactate concentrations, gas exchanges and substrates utilization and partitioning at different power outputs during the submaximal incremental tests 1 (SIT1) and SIT2.

Table 4. Time courses of $\dot{V}E$, VR, $\dot{V}O_2$, HR and blood lactate concentration during recovery following the submaximal incremental tests 1 (SIT1) and SIT2.

Figure legends

Figure 1. Slope coefficient of the $\dot{V}O_2$ vs. work rate relationship before (SIT1) and after (SIT2) training. Dots and squares are the individual values before and after training, respectively.

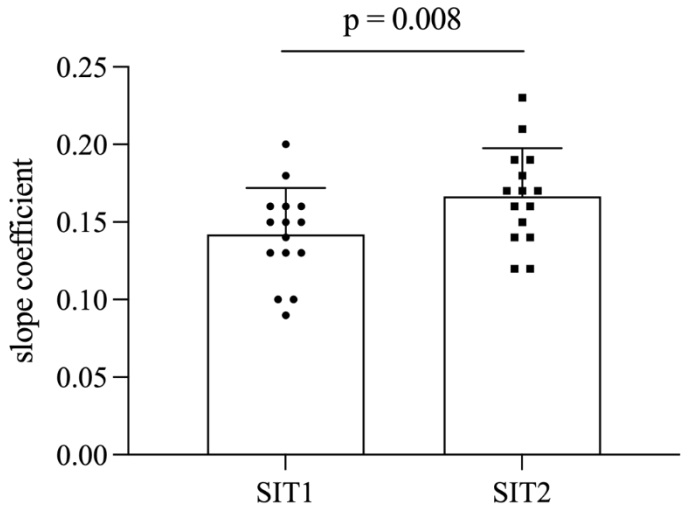
Figure 2. A: Lactate accumulation as a marker of i) pH decrease triggering the polymerization/sickling cascade, and ii) sympathetic nervous system (SNS) activation and adrenaline production triggering vasoconstriction and cell adhesion, respectively, all of which ultimately leading to hemodynamic disturbances and potentially vaso-occlusive crisis (VOC). B: By decreasing blood lactate accumulation due to decreased SNS activation and improved oxygen consumption, endurance training should blunt hemodynamic disturbances and risk of VOC for a given submaximal (moderate-intensity) exercise.

Table 4. Time courses of $\dot{V}E$, VR, $\dot{V}O_2$, HR and blood lactate concentration during recovery following the submaximal incremental tests 1 (SIT1) and SIT2.

		ACTIVE			PASSIVE				
		0	**2**	**Δ 0-2**	**0**	**2**	**4**	**6**	**Δ 0-6**
$\dot{V}E$ ($L \cdot min^{-1}$)	SIT1	52.9 ± 7.6	35.5 ± 5.8	-17.4 ± 7.9	31.2 ± 4.6	19.4 ± 4.8	17.1 ± 4.4	17.1 ± 3.2	-34.7 ± 5.1
	SIT2	53.0 ± 6.7	34.3 ± 5.7	-18.7 ± 6.5	32.0 ± 5.9	18.9 ± 4.4	16.8 ± 4.5	16.7 ± 4.7	-36.5 ± 4.8
		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
VR ($cycle \cdot min^{-1}$)	SIT1	39.7 ± 11.5	35.4 ± 11.4	4.4 ± 6.6	30.6 ± 8.6	24.1 ± 4.6	21.5 ± 4.6	21.0 ± 4.2	-15.0 ± 5.5
	SIT2	37.2 ± 7.2	30.0 ± 6.8	-7.2 ± 4.3	28.8 ± 6.0	23.0 ± 4.3	21.4 ± 3.9	22.4 ± 4.02	-14.1 ± 4.7
		NS	0.04	NS	NS	NS	NS	NS	NS
$\dot{V}O_2$ ($L \cdot min^{-1}$)	SIT1	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.2	-0.3 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.4	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	-0.6 ± 0.1
	SIT2	1.1 ± 0.3	0.7 ± 0.2	-0.4 ± 0.2	0. 7 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.2	-0.8 ± 0.2
		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.02
HR ($beats \cdot min^{-1}$)	SIT1	156.0 ± 14.4	131.6 ± 14.7	-24.4 ± 8.4	126.5 ± 14.4	103.6 ± 10	97.5 ± 10.4	97.4 ± 9.3	-28.0 ± 12.1
	SIT2	154.1 ± 16.2	124.5 ± 10.1	-29.6 ± 7.5	121.6 ± 9.8	99.5 ± 8.4	95.7 ± 9.3	94.9± 10.4	-24.7.0 ± 9.2
		NS	0.02	0.02	NS	NS	NS	NS	NS
$[lactate]_b$ ($mmol \cdot L^{-1}$)	SIT1	4.8 ± 0.6	4.9 ± 0.6	0.0 ± 0.4	4.8 ± 0.7	4.5 ± 0.5	4.1 ± 0.6	4.1 ± 0.4	-0.7 ± 0.4
	SIT2	5.0 ± 0.6	5.0 ± 0.6	-0.0 ± 0.2	5.0 ± 0.6	4.6 ± 0.6	4.2 ± 0.8	3.9 ± 0.5	-1.3 ± 0.5
		NS	NS	NS	NS	NS	0.05	0.01	0.01

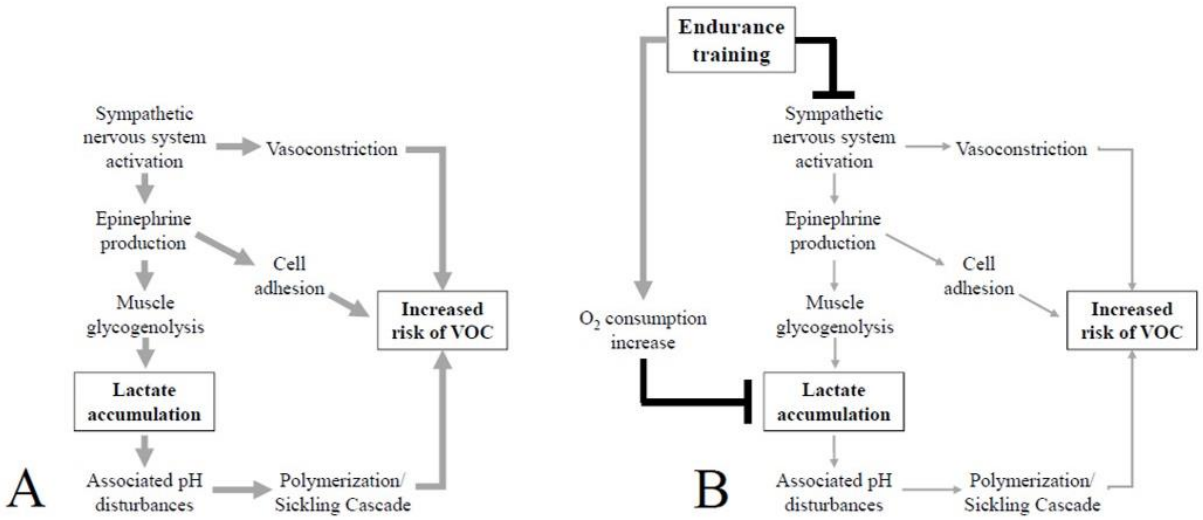
Values are mean ± standard error. $\dot{V}E$: minute ventilation, VR: ventilation rate, $\dot{V}O_2$: oxygen uptake, HR: Heart Rate. $[lactate]_b$: blood lactate concentration. SIT1: First session, SIT2: Second session; p = probability, NS: Not significant.

473 Figure 32



474

475 Figure 2.


A
Sympathetic nervous system activation
Vasoconstriction
Epinephrine production
Cell adhesion
Muscle glycogenolysis
Increased risk of VOC
Lactate accumulation
Associated pH disturbances
Polymerization/ Sickling Cascade
B
Endurance training
Sympathetic nervous system activation
Vasoconstriction
Epinephrine production
Cell adhesion
O_2 consumption increase
Muscle glycogenolysis
Increased risk of VOC
Lactate accumulation
Associated pH disturbances
Polymerization/ Sickling Cascade

ETUDE 3 : Limites du modèle murin dans le remodelage du muscle strié squelettique : étude de physiologie comparée entre humains et souris (modèle Townes) CON, SCT et SCD.

Article en cours d'écriture et formaté pour une publication, présenté ci-dessous en français.

Contexte et objectif de l'étude n°3.

Les souris étudiées ont été élevées par Benjamin Chatel pour une de ses études, réalisées dans le cadre de sa thèse soutenue en 2017 (Chatel, 2017). Différentes analyses ont été réalisées : Analyse des protéines impliquées dans la régulation du pH musculaire par Western Blot et analyses des activités enzymatiques. Pour cette étude n°3 et dans l'objectif d'établir les limites du modèle de souris Townes, des analyses histologiques ont été réalisées pour déterminer la structure des fibres musculaires et analyser le réseau microvasculaire. Manon Rojo a largement contribué aux traitements des données des analyses de capillaires dans le cadre de son stage de Master 2.

Etude de physiologie comparée entre humains et souris (modèle Townes) CON, SCT et SCD

Manon Rojo[1], Manon Riccetti[1], Benjamin Chatel[1], David Bendahan[2], Léonard Féasson[3,4], Laurent A. Messonnier[1].

[1] Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité, Université Savoie Mont Blanc, Chambéry, France.

[2]Aix-Marseille Université, CNRS, CRMBM, Marseille, France.

[3] Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité, Université de Lyon, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, France.

[4] Unité de Myologie, Service de Physiologie Clinique et de l'Exercice, Hôpital Universitaire de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France.

Résumé

Les patients drépanocytaires présentent un remodelage musculaire et microvasculaire. Cependant, aucune étude n'a rapporté de similitudes dans la physiopathologie musculaire entre les humains et le modèle murin de la drépanocytose. **But.** L'objectif de cette étude était d'analyser le remodelage musculaire de souris Townes drépanocytaires (HbSS), porteuses du trait drépanocytaire (HbAS) et contrôles (HbAA) et d'observer les similitudes avec celui de patients drépanocytaires (HbSS), de porteurs de traits drépanocytaires HbAS) et de sujets contrôles (HbAA). **Méthodes.** L'étude a été réalisée sur 9 souris SCD, 10 souris SCT et 10 souris CON. Des analyses ont été effectuées pour la microvascularisation, le typage de fibres musculaire et la présence de signes cliniques par coloration histochimique. La quantité relative de mécanismes impliqués dans la régulation du pH musculaire (MCT1, 2 et 4 et CAII et CAIII) par Western Blot et l'activité enzymatique de la créatine kinase (CK), de la citrate synthase (CS) et de la lactate déshydrogénase (LDH) sont des données extraites d'une étude précédente. **Résultats.** Les résultats montrent que le remodelage musculaire chez les souris Townes HbSS diffère de celui des patients SCD sur les différents paramètres analysés. **Conclusion.** Les limites du modèle murin de Townes sont donc à discuter pour les futures stratégies thérapeutiques.

Introduction

La drépanocytose (SCD) est l'une des maladies autosomiques récessives les plus courantes dans le monde avec environ cinq millions de personnes touchées (Piel et al., 2017). Cette maladie héréditaire est caractérisée par la production d'une hémoglobine anormale : Hémoglobine S (HbS). Dans un état désoxygéné, l'HbS polymérise, le globule rouge (GR) est fragile, plus rigide et prend une forme de faucille (Kaul et al., 1983; Noguchi et al., 1993). Ces nouvelles caractéristiques induisent une anémie hémolytique sévère (Rees et al., 2010) ainsi que des crises vaso-occlusives qui sont délétères pour les (Chirico & Pialoux, 2012; Eltzschig & Eckle, 2011; Kaul & Hebbel, 2000). Ces deux complications majeures de la maladie conduisent souvent à une défaillance des organes vitaux et à un dysfonctionnement des muscles squelettiques (Gladwin & Sachdev, 2012). En effet, des études récentes décrivent un remodelage musculaire sur le plan microvasculaire, structural, énergétique et fonctionnel chez les patients drépanocytaires (Merlet et al., 2019; Ravelojaona et al., 2015; Vincent et al., 2010). Concernant la microcirculation, la drépanocytose induit une raréfaction du réseau microvasculaire, caractérisé par une densité capillaire et un nombre de fibres par capillaire amoindris chez les patients (Ravelojaona et al., 2015). En raison de l'anémie qui induit une fatigue, et des risques possibles associés à la pratique de l'activité physique (voir chapitre 4), les patients adoptent un mode de vie sédentaire qui impacte la structure du muscle squelettique caractérisé par une hypo-/atrophie musculaire associée à une proportion plus importante de fibres de type I, et une diminution de la proportion de fibres de type II par rapport à des sujets sains (Ravelojaona et al., 2015).

L'étude du remodelage musculaire chez les patients drépanocytaires est une priorité pour améliorer la qualité de vie des patients. Cependant, mener des études invasives et mécanistiques sur les humains peut poser des problèmes (organisationnels, financiers et surtout éthiques).

L'utilisation de modèles murins transgéniques est dans ce cadre une alternative séduisante (Trudel et al., 1991). Pour pouvoir transposer les observations faites dans ces modèles aux humains atteints de la drépanocytose, les modèles murins drépanocytaires doivent avoir une physiopathologie aussi similaire que possible à celle observée chez l'Homme. Il existe différents modèles de souris drépanocytaires rapportés dans la littérature tels la souris SAD (Trudel et al., 1994), la souris BERK (Manci et al., 2006) et la souris Townes (Charrin, 2017). La souris Townes est actuellement le modèle murin qui développe la physiopathologie la plus similaire à celle observée chez les patients drépanocytaires (Tableau 1). Cependant, aucune similitude entre le remodelage musculaire présent chez les patients SCD et le modèle murin de Townes n'a encore été démontrée.

L'objectif de cette étude est donc de mettre en évidence les caractéristiques du muscle strié squelettique chez des souris Townes drépanocytaires (HbSS), porteuses du trait drépanocytaire (HbAS), et contrôles (HbAA) et de les comparer à ce qui est connu chez l'Homme. L'hypothèse avancée dans cette étude était que le remodelage microvasculaire, structural et énergétique du muscle squelettique des souris HbSS et HbAS Townes serait similaire à celui observé chez l'Humain SCD et SCT.

Matériel et méthodes

Soins et alimentation des animaux

Le modèle murin Townes a été utilisé dans les différentes expériences réalisées. 10 souris mâles saines (HbAA), 10 souris porteuses du trait drépanocytaire (HbAS) et 9 souris drépanocytaires (HbSS) âgées de 5 mois ont été étudiées. Les souris étaient conformes i) aux directives Françaises pour la protection des animaux, ii) à la Convention européenne sur la

protection des animaux utilisés à des fins expérimentales et iii) aux directives institutionnelles n° 86/609/CEE du 24 novembre 1986. Toutes les expériences menées sur ces animaux ont également été approuvées par le Comité Institutionnel de Garde des Animaux d'Aix-Marseille (numéro d'autorisation : 01835.02.). Les souris ont été placées dans un environnement contrôlé (température de 22° et cycle lumière-obscurité de 12-12 h). Elles ont reçu de l'eau et de la nourriture standard.

Prélèvement de tissus

Les souris ont d'abord été anesthésiées par voie intrapéritonéale avec un mélange de kétamine (110 mL/kg) et de xylazine (10 mL/kg). Les muscles soléaire, plantaire, gastrocnémien, tibialis antérieur et extenseur des membres inférieurs droit et gauche ont été soigneusement disséqués mais le gastrocnémien a été principalement utilisé pour les différentes analyses. Ensuite, les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale. Le muscle a été immergé dans de l'azote liquide avant d'être conservé dans un congélateur à -80°C. Cet échantillon a été utilisé pour l'étude enzymatique et pour la quantification des mécanismes impliqués dans la régulation du pH musculaire.

Le muscle de l'autre membre inférieur a été monté sur Cryomount (milieu d'incorporation), plongé dans de l'isopentane, puis congelé dans l'azote liquide. Les muscles montés ont été conservés dans un congélateur à -80°C et ont été utilisés pour des analyses histochimiques et immunohistochimiques.

Caractéristiques structurelles et signes cliniques

Le typage des fibres musculaires (fibres glycolytiques, fibres glyco-oxydatives et fibres odyxatives) et la quantification des fibres nécrotiques et des internalisations nucléaires ont été effectués par analyse histochimique. Des coupes transversales de 10 µm d'épaisseur du muscle

gastrocnémien ont été réalisées dans un cryostat et déposées sur des lames SuperFrost pour effectuer 4 colorations : NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Tétrazolium Réductase), COX (Cytochrome C Oxydase), COX/SDH (Cytochrome C Oxydase/Succinate Déshydrogénase) et HES (Hemalum Eosine Saffron). Pour la coloration au NADH, les sections musculaires ont été incubées à 37°C pendant 30 minutes dans un milieu réactionnel. Le milieu réactionnel était une solution de nitro blue tétrazolium, de NADH et de tampon Tris 0,2 M. Après l'incubation, les lames ont été rincées à l'eau distillée, puis une fine lamelle a été collée à la lame avec un support de montage Aquatex pour protéger les sections.

Pour la coloration COX, les sections musculaires ont été incubées pendant 2 heures à 37°C dans un milieu réactionnel. Le milieu réactionnel était une solution de cytochrome C, de saccharose, de solution de catalase et de solution de diaminobenzidine. Après incubation, les lames ont été rincées à l'eau distillée puis immergées dans 3 bains d'alcool successifs (95°, 100°, 100°) suivis d'un dernier bain de xylène. La fine lamelle a été collée avec un support de montage Eukitt pour protéger les sections.

Pour la coloration COX/SDH, les sections ont été incubées pendant deux heures dans un milieu réactionnel chauffé à 37°C au bain-marie. Le milieu d'incubation était une solution de tampon phosphate de 0,2 M, d'eau distillée et de 20 mg de NBT. Les lames ont ensuite été rincées à l'eau distillée et la fine lamelle a été collée sur le rebord de la lame avec un support de montage Aquatex.

Pour la coloration HES, les lames ont été immergées dans 3 bains de coloration différents. Le premier était un bain d'Hemalum pendant 5 minutes, les lames étaient ensuite rincées à l'eau distillée. Le deuxième bain était un bain d'Eosi pendant 2 minutes, les lames étaient ensuite rincées dans 2 deux bains successifs d'alcool absolu. Le dernier bain était un bain de Saffran pendant 5 minutes. Ensuite, les lames ont été rincées dans 3 bains d'alcool (95°, 100°, 100°) et dans un bain de xylène. La feuille de lame a été collée avec un support de montage Eukitt.

131

132 ***Caractéristiques enzymatiques***

133 Une analyse enzymatique a été réalisée sur les muscles gastrocnémiens dans une étude
134 précédente (Chatel et al., 2017). Dans ce projet de thèse, les données enzymatiques de l'activité
135 maximale de la créatine kinase (CK), de la myokinase (MK), de la citrate synthase (CS), de
136 l'énolase (ENO), de l'hexokinase (HK) et de la lactate déshydrogénase (LDH) ont été reprises.

137

138 ***Contenu musculaire de protéines impliquées dans la régulation du pH***

139 La quantification relative de protéines impliquées dans la régulation du pH a été réalisée
140 dans une étude précédente (Chatel et al., 2017) par Western Bet sur 30 mg de muscle
141 gastrocnémien. Les résultats sur la quantification relative des MCT1, MCT2 et MCT4 et la
142 quantification relative des CAII et CAIII ont été récupérés.

143

144 ***Analyse de réseau microvasculaire***

145 L'analyse morphométrique de la microvascularisation a été réalisée en colorant les
146 capillaires avec l'anticorps CD31 (Dako, Glostrup, Danemark). Le logiciel ImageJ a été utilisé
147 pour analyser le réseau microvasculaire avec des paramètres mesurés de densité de réseau
148 microvasculaire (CD : nombre de capillaires par mm^2, et CAF : le nombre de capillaires en
149 contact avec une fibre musculaire). 90 capillaires ont été analysés dans le même champ pour
150 mesurer les caractéristiques morphologiques des micro-vaisseaux (CapTor, Capillary Surface
151 Area CSA ; périmètre du capillaire CP et diamètre extérieur du capillaire COD). D'autres
152 indices fonctionnels ont été rapportés comme la longueur de contact entre une fibre musculaire
153 et les capillaires environnants (LC) et le rapport LC/PF qui indique la surface d'échange entre
154 une fibre musculaire considérée et les capillaires environnants.

155

Analyse statistique

Les données récupérées sur l'activité enzymatique et les mécanismes de régulation du pH musculaire sont des données qui ont déjà été traitées dans une étude précédente (Chatel et al., 2017). Les données sont présentées sous forme de moyenne et d'écart-type moyen, et des analyses statistiques ont été effectuées sur la version 9 du logiciel Statistica. La normalité a été vérifiée avec un test de Kolmogorov-Smirnov. Des ANOVA à un facteur ont été utilisées pour comparer les paramètres et une analyse post-hoc avec le test de Newman-Keuls a été effectuée lorsqu'un effet principal a été trouvé.

Les données sur la typologie musculaire et les signes cliniques du muscle squelettique ont été présentées sous forme de moyenne et d'écart type moyen. Leur traitement statistique a été effectué avec le logiciel JASP (JASP version 0.14.0.0). La normalité a été vérifiée avec un test de Shapiro-Wilk, et des ANOVA à un facteur ont été effectuées pour comparer les paramètres entre les différents groupes. Si un effet principal a été trouvé, une analyse post-hoc avec le test de Tuckey a été effectuée. Le seuil de significativité a été fixé à $p \leq 0.05$.

Résultats

Caractéristiques structurelles

La Figure 1 représente les résultats de la distribution du type de fibres dans le muscle squelettique dans les 3 groupes de souris HbAA, HbAS et HbSS. Aucune différence significative n'a été observée pour la distribution des fibres oxydatives et glyco-oxydatives. D'autre part, en ce qui concerne la distribution des fibres glycolytiques, l'analyse statistique a révélé une différence significative entre les souris HbAA et HbSS : Les souris HbAA ont plus de fibres glycolytiques (39,48%) que les souris HbSS (22,96%) ($p < 0.05$).

*** Insérer la Figure 1 ***

Caractéristiques enzymatiques

Le Tableau 2 représente les activités enzymatiques de certaines des enzymes impliquées dans l'activité énergétique du muscle squelettique. Pour MK, CK, HEX, LDH et CS, aucune différence significative n'a été observée entre les trois groupes de souris. L'activité ENO était plus élevée chez les souris HbSS et HbAS que chez leurs homologues HbAA et le rapport ENO/CS était plus élevé chez les HbSS et HbAS que chez les souris HbAA (Chatel et al., 2017).

*** Insérer le Tableau 2 ***

Contenu musculaire de protéines impliquées dans la régulation du pH

Aucune différence significative n'a été observé (Figure 2) concernant les protéines impliquées dans la régulation du pH (Chatel et al., 2017).

**** Insérer la Figure 2 ***

Signes cliniques

Le Tableau 3 rapporte deux des signes « cliniques » dans le muscle squelettique chez les souris HbAA, HbAS et HbSS : la présence de cellules nécrotiques et la présence d'internalisation nucléaire. Aucune différence significative n'a été observée pour ces deux signes cliniques entre les trois groupes de souris.

*** Insérer le Tableau 3 ***

Microvascularisation musculaire

La Figure 3 représente les indices du réseau microvasculaire. **A :** Tortuosité du capillaire (CapTor) mesurée au moyen de l'équation suivante : Surface capillaire / ∏(diamètre extérieur

capillaire/2)^2. **B :** Périmètre du capillaire. **C :** Aire du capillaire. **D :** Diamètre extérieur du capillaire (COD). Il n'y avait pas de différences significatives entre les groupes de souris.

*** Insérer la Figure 3 ***

Discussion

L'objectif de cette étude était d'observer les similitudes entre les caractéristiques musculaires de souris atteintes de drépanocytose (HbSS), porteuses du trait drépanocytaire (HbAS) et contrôles (HbAA) avec celles observées chez les patients SCT et SCD.

Les premiers résultats de cette étude montrent qu'il existe un remodelage dans la distribution typologique des fibres musculaires squelettiques chez les souris HbSS. Chez la souris, le typage des fibres a été effectué en colorant des sections musculaires avec du NADH pour déterminer si les fibres étaient principalement glycolytiques ou oxydatives. La distribution des fibres glycolytiques était diminuée de près de 42 % entre les groupes HbAA et HbSS : 40% de fibres glycolytiques dans l'HbAA contre 23 % de fibres glycolytiques dans l'HbSS. Si une corrélation entre les fibres glycolytiques et les fibres de type II est possible, ce résultat peut être confronté à l'étude de Ravelojaona (Ravelojaona et al., 2015) qui a montré une diminution de la proportion de fibres IIa. En dépit de l'absence d'une différence significative dans la proportion de fibres oxydatives entre les souris HbSS et HbAA, les changements dans la répartition des différents types de fibres chez la souris mâle miment assez bien ce qui est retrouvé chez l'homme (mâle également). De plus, les souris HbAA ont plus de fibres glycolytiques (39,48%) que les souris HbSS et c'est ce qui est retrouvé aussi chez l'Homme (Ravelojaona et al., 2015).

Les activités enzymatiques du métabolisme énergétique des muscles squelettiques présentées dans cette étude ont été étudié par Chatel et al. en 2017 et avaient montré que chez

les souris Townes HbSS, le rapport ENO/CS était augmenté de 26% par rapport à aux souris saines et de 15% chez les souris HbAS par rapport aux souris saines (Chatel et al., 2017). Ces résultats suggéraient donc une diminution de la capacité oxydative chez les souris Townes HbAS, ainsi qu'une diminution encore plus importante chez les souris Townes HbSS. Ces résultats sont très similaires à ceux retrouvés de chez l'homme. En effet, en 2015, l'étude de Ravelojaona avait souligné que l'activité enzymatique du CS était diminuée de près de 14% chez les patients SCD par rapport aux sujets sains (Ravelojaona et al., 2015).

La quantification relative de protéines impliquées dans la régulation du pH musculaire chez les patients SCD et sujets SCT a été réalisée pour la première fois dans l'étude n°1 de la présente thèse. Seules des différences significatives ont été observés pour MCT4 et CAII entre les sujets SCT et les patients SCD. Dans la présente étude, chez la souris, aucune différence significative n'a été observée entre les trois groupes.

L'internalisation nucléaire est un signe de régénération musculaire (Almomen et al., 2020; Valeriano-Marcet & Kerr, 1991) or, aucun signe d'augmentation ou de diminution de ce phénomène causé par drépanocytose n'a été observé chez les souris Townes HbAS et HbSS par rapport aux souris contrôles HbAA. Chez l'Homme, le nombre d'internalisations nucléaires est plus élevé chez les sujets SCT (Ravelojaona et al., 2015). Il n'y avait pas de fibres nécrotiques sur les sections musculaires étudiées pour les trois groupes de souris et ce résultat est similaire à celui obtenu chez l'Homme. Dans l'étude de Ravelojaona (Ravelojaona et al., 2015) il avait été démontré une raréfaction des micro-vaisseaux, une diminution de la tortuosité des capillaires et un élargissement de la lumière entrante chez l'Homme SCD. Chez la souris, aucune différence n'a été observé sur ces différents paramètres de microvascularisation.

Bien qu'il y ait des similitudes dans le typage de fibres entre la souris saine, SCT et SCD, et l'Homme sain, SCT et SCD, le muscle des souris SCD semblent moins affecté que les souris témoins. L'ensemble de ces résultats questionne sur le mode de vie des souris étudiées. En effet,

celles-ci sont hyper-sédentarisées lorsqu'elles se retrouvent dans leur cage, elles ne peuvent pratiquer aucune activité physique, délibérément dépourvues de roue. En liberté, les souris explorent leur environnement et se déplacent notamment la nuit, avec de petites courses courtes. Les souris Townes étudiées dans cette étude sont donc hyper-sédentaires par rapport aux Hommes étudiés et pour qui l'activité quotidienne n'était pas modifiée (Ravelojaona et al., 2015). Cette subtilité pourrait noyer d'éventuelles différences significatives sur le plan structurel et énergétique, des souris saines et malades.

Conclusion

Cette étude a comparé les caractéristiques de remodelage musculaire chez les sujets SCT et les patients SCD, avec celles de souris Townes HbAS et HbSS. Les résultats semblent montrer des différences entre les deux populations étudiées. Ainsi, la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques étudiées dans un premier temps chez la souris, présente certaines limites à prendre en considération dans l'interprétation des résultats. Le remodelage observé chez la souris Townes n'est pas forcément retrouvé chez l'Homme.

Tableaux

Tableau 1. Comparaison de la physiopathologie entre l'homme drépanocytaire et les modèles murins drépanocytaires : souris SAD, souris BERK et souris TOWNES.

Tableau 2. Activité enzymatique du muscle squelettique gastrocnémien chez les trois groupes de souris HbAA, HbAS et HbSS.

Tableau 3. Signes cliniques du muscle squelettique gastrocnémien chez les trois groupes de souris HbAA, HbAS et HbSS.

Légendes des figures

Figure 1. Distribution du type de fibres dans le muscle squelettique gastrocnémien chez les trois groupes de souris HbAA, HbAS, HbSS.

Figure 2. Mécanismes impliqués dans la régulation du pH musculaire chez les trois groupes de souris HbAA, HbAS et HbSS.

Figure 3. Données du réseau de microvascularisation chez les souris HbAA, HbAS et HbSS.

Tableau 1. Comparaison de la physiopathologie entre l'homme drépanocytaire et les modèles murins drépanocytaires : souris SAD, souris BERK et souris TOWNES.

	Patient drépanocytaire	Souris SAD	Souris BERKE	Souris TOWNES
% HbS	95 %	19 %	Haut	Haut
% d'HbF à la naissance	70 à 90 %	0 %	Bas	30 à 50 %
Diminution de l'espérance de vie	√	√	√	√
Anémie	√	X	√	√
Événement vaso-occlusif	√	√	√	√
Hématologie				
↓ Nombre de GRs	√	X	√	√
↓ Concentration d'hémoglobine	√	X	√	√
↓ Hématocrite	√	X	√	√
Anisocytose	√	X	√	√
Poïkilocytose	√	X	√	√
Rate				
Hypertrophie	√	√	√	√
Congestion	√	√	√	√
Dépôts d'hémosidérine	√	√	√	√
Infarctus	√	X	√	√
Poumon				
Infarctus	√	√	X	√
Thrombose	√	√	X	√
Hémorragies	√	√	√	√
Dépôts d'hémosidérine	√	√	?	√
Congestion	√	X	√	√
Œdème	√	X	X	√
Syndrome thoracique aigu	√	√	X	√

Rein				
Congestion	√	√	X	√
Glomérulosclérose	√	√	√	√
Dépôts d'hémosidérine	√	√	X	√
Concentration d'urine diluée	√	?	√	√
Foie				
Hyperplasie cellules Kupffer	√	√	√	√
Congestion	√	√	√	√
Dépôts d'hémosidérine	√	√	√	√
Érythrophagocytose	√	X	√	√

HbS : Hémoglobine S anormale ; HbF : Hémoglobine fœtale. √ : lorsqu'il y a une similitude entre le patient drépanocytaire et la souris comparée. x **:** lorsqu'il n'y a pas de similitude entre le patient drépanocytaire et la souris comparée**.**

299 **Tableau 2.** Activité enzymatique du muscle squelettiques gastrocnémien chez les trois groupes

300 de souris HbAA, HbAS et HbSS.

	HbAA	HbAS	HbSS
MK, UI/mg	2.57 ± 0.41	2.48 ± 0.29	2.48 ± 0.40
CK, UI/mg	14.4 ± 1.7	14.5 ± 0.9	16.1 ± 1.4
HEX, UI/mg	0.037 ± 0.006	0.037 ± 0.006	0.035 ± 0.004
ENO, UI/mg	3.35 ± 0.48	3.88 ± 0.44*	4.03 ± 0.34*
LDH, UI/mg	5.4 ± 1.0	5.4 ± 0.8	5.3 ± 0.4
CS, UI/mg	0.055 ± 0.003	0.055 ± 0.003	0.053 ± 0.003
ENO/CS	60.7 ± 6.4	70.0 ± 5.5*	76.5 ± 8.0**

301

302 Données extraites de l'article de Chatel en 2017 (Chatel et al., 2017). Les données sont

303 présentées sous forme de moyennes ± erreur standard. HbAA : Souris saine, HbAS : Souris

304 porteuse du trait drépanocytaire, HbSS : Souris drépanocytaire ; MK : Myokinase, CK :

305 Créatine Kinase, HEX : Hexokinase, ENO : Enolase, LDH : Lactate Déshydrogénase, CS :

306 Citrate Synthase. *Et **, significativement diffèrent des souris HbAA ($P < 0.05$ and $P < 0.01$,

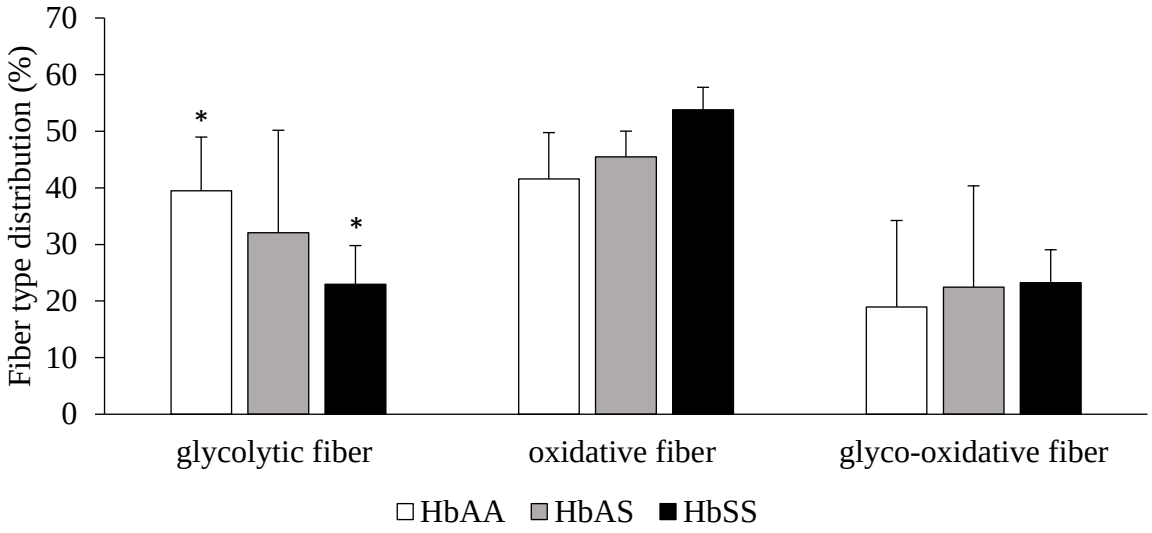
307 respectivement).

Tableau 3. Signes cliniques du muscle squelettique gastrocnémien chez les trois groupes de souris HbAA, HbAS et HbSS.

	HbAA	HbAS	HbSS
Cellules nécrotiques	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Internalisations nucléaires	9 ± 10	7 ± 7	14 ± 9

Les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart type. HbAA : Souris saine, HbAS : Souris porteuse du trait drépanocytaire, HbSS : Souris drépanocytaire**.**

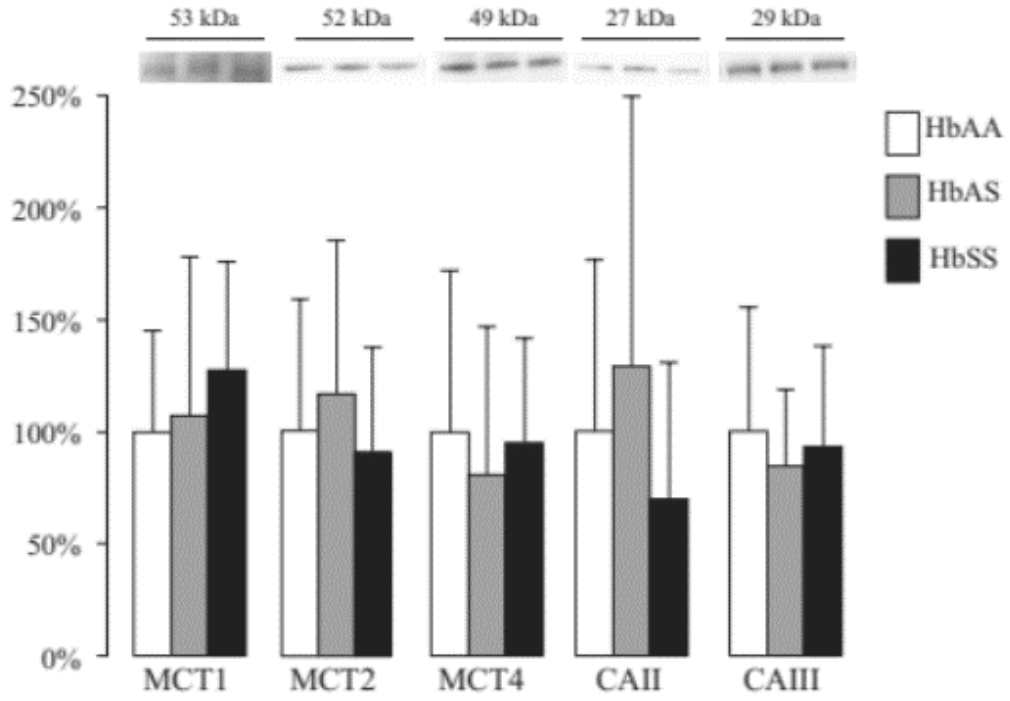
313 **Figure 1.** Distribution du type de fibres dans le muscle squelettique gastrocnémien chez les
314 trois groupes de souris HbAA, HbAS, HbSS.
315



316

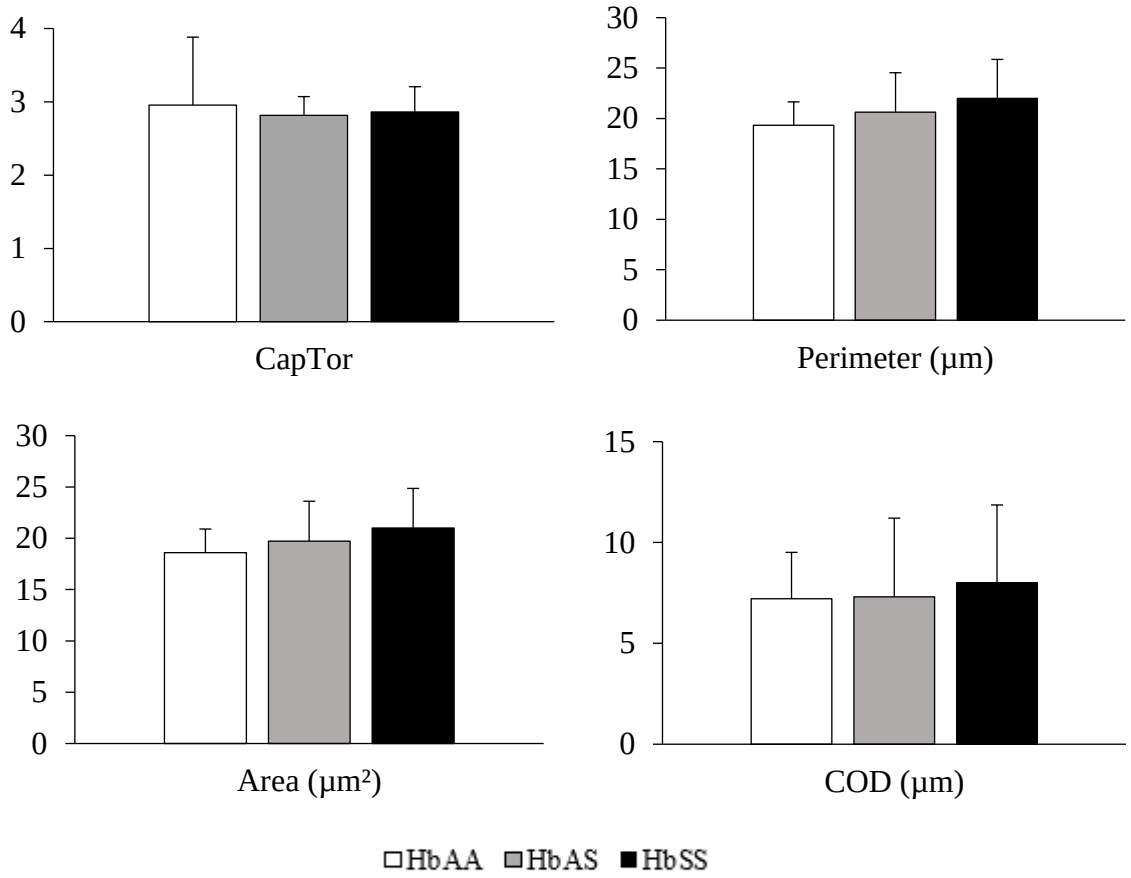
317 Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes ± écart type. *correspond à une
318 différence significative avec un $p \leq 0.05$: les souris HbAA ont significativement plus de fibres
319 glycolytiques que les souris HbSS. HbAA : Souris saine, HbAS : Souris porteuse du trait
320 drépanocytaire, HbSS : Souris drépanocytaire.

Figure 2. Mécanismes impliqués dans la régulation du pH musculaire chez les trois groupes de souris HbAA, HbAS et HbSS.



Graphique issu de l'article de Chatel en 2017 (Chatel et al., 2017). Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ± erreur standard. HbAA : Souris saine, HbAS : Souris porteuse du trait drépanocytaire, HbSS : Souris drépanocytaire**.** Aucune différence significative n'est observée entre les différents groupes de souris.

Figure 3. Données du réseau de microvascularisation chez les souris HbAA, HbAS et HbSS.



Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ± écart type.

HbAA : Souris saine, HbAS : Souris porteuse du trait drépanocytaire, HbSS : Souris drépanocytaire. CapTor : tortuosité des micro vaisseaux, COD : diamètre extérieur moyen des micro vaisseau

ETUDE 4 : Influence de l'HU sur les caractéristiques microvasculaires, structurales et énergétiques du muscle strié squelettique de souris Townes SCD.

Article en cours d'écriture et formaté pour une publication, présenté ci-dessous en français.

Contexte et objectif de l'étude n°4.

Dans le cadre d'une thèse réalisée par Constance Michel à Marseille, un élevage de souris sous traitement par HU a été créer pour répondre à ses différentes problématiques, et à celles proposées dans ce manuscrit de thèse pour l'étude n°4. Les biopsies musculaires de 4 groupes de souris Townes étaient initialement prévus (un groupe contrôle SCD ; un groupe sous traitement par HU, SCD-HU, un groupe entraîné ENT, et un groupe entraîné sous HU, ENT-HU) pour des analyses par Western Blot (différentes protéines d'intérêt CAII, CAIII, MCT1, MCT2 et MCT4), des analyses immunohistochimiques (indices de dégénérescence et de régénération musculaire, et microvascularisation avec caractéristiques morphologiques des micro-vaisseaux) et des analyses des activités enzymatiques (ENO, CS, MK, CPK et LDH). En raison du manque de résultats observables par l'entraînement et dans l'objectif de comprendre réellement l'impact de l'HU, les souris entraînées ont été associées au groupe contrôle, SCD, et les souris entraînées sous HU ont été associées au groupe sous HU, SCD-HU.

Effets de l'hydroxyurée (HU) sur la microvascularisation et la structure des muscles squelettiques des souris atteintes de drépanocytose

Manon Riccetti[1], Constance Michel[2], Léonard Féasson[3,4], David Bendahan[2], Laurent A. Messonnier[1].

[1]Université Savoie Mont Blanc, Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité EA7424, Chambéry, France.

[2]Aix-Marseille Université, CNRS, CRMBM, Marseille, France.

[3]Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité, Université de Lyon, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, France.

[4]Unité de Myologie, Service de Physiologie Clinique et de l'Exercice, Hôpital Universitaire de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France.

Résumé

Objectif. Pour améliorer le profil clinique et la qualité de vie des patients atteints de drépanocytose, l'hydroxyurée (HU) est une approche thérapeutique privilégiée et est devenue le principal traitement médicamenteux actuellement utilisé. L'HU est le seul médicament efficace pour réduire (d'environ 50%) la fréquence des épisodes douloureux chez les adultes, les adolescents et les enfants. Ce traitement réveille la synthèse de l'hémoglobine fœtale (HbF), ce qui a plusieurs conséquences. Premièrement, avec l'augmentation d'HbF, la proportion d'HbS diminue et ainsi que le contenu en HbS dans les globules rouges. Deuxièmement, l'HbF a une affinité plus élevée pour l'oxygène que l'HbS, ce qui réduit la désoxyhémoglobine. Collectivement, ces deux raisons (i) réduisent l'hémolyse et les CVO, (ii) améliorent le profil clinique des patients et (iii) augmentent la qualité de vie et l'espérance de vie des patients. Cependant, les avantages et les effets spécifiques de ce traitement sur le métabolisme énergétique musculaire sont encore inconnus. **Méthodes**. Dans la présente étude, nous avons évalué les effets de l'HU sur les caractéristiques morphologiques musculaire, la microvascularisation, le profil énergétique et les mécanismes impliqués dans la régulation du pH musculaire de deux groupes de souris drépanocytaires de modèle Townes : 16 souris ont été étudiées à 2,0 ± 0,5 mois sans aucune intervention (SCD) et 13 souris ont été supplémentées en HU pendant 8 semaines (SCD-HU). Nous avons émis l'hypothèse que les défauts observés chez les souris sans traitement seraient réduits chez les souris traitées. **Résultats.** Les résultats n'ont montré aucune différence significative dans la quantité de protéines impliquées dans la régulation du pH musculaire et dans les caractéristiques énergétiques entre les deux groupes de souris. En ce qui concerne les caractéristiques capillaires, les souris traitées par HU (SCD-HU) ont un diamètre extérieur de capillaire (COD) plus élevé, une aire de capillaire plus élevée et un périmètre capillaire plus élevé que les souris CON.

Introduction

Si des essais de thérapie génique sont en cours (Ribeil et al., 2017), l'allogreffe de moelle osseuse reste le seul traitement curatif en cas de drépanocytose (SCD) sévère. Cependant, chez les patients sans frère HLA identique/compatible, ou refusant la procédure de greffe, ou trop âgés pour la greffe, ou chez qui il existe une contre-indication, l'hydroxyurée (HU) est le seul médicament dont il a été prouvé qu'il améliorait le profil clinique des patients à court, moyen et long termes avec une toxicité ou des effets indésirables acceptables (Ferster et al., 1992, 2001; Vermylen et al., 1988). L'HU appelée aussi hydroxycarbamide, a été testée pour la première fois dans la SCD en 1984 et depuis elle est devenue le traitement thérapeutique de référence. En effet, c'est le seul médicament efficace dont il a été prouvé qu'il réduisait de 50% la fréquence des épisodes douloureux chez l'adulte, l'adolescent et l'enfant (Agrawal et al., 2014).

Des études montrent que l'utilisation de l'HU peut réduire les complications de la drépanocytose, en particulier la douleur, les hospitalisations, les transfusions sanguines, le syndrome thoracique aigu et la mortalité (Stettler et al., 2015; Voskaridou et al., 2010; Wang et al., 2011; Wong et al., 2014; Yawn et al., 2014).

Depuis plus de 35 ans, de nombreuses études ont démontré que l'HU doublait la production d'HbF. L'HU est utilisé pour sur son effet inhibiteur sur la polymérisation de l'HbS, entraînant ainsi une diminution du nombre de cellules falciformes circulantes, et à terme une diminution du risque de crises vaso-occluses et d'infarctus (Ware, 2010). L'HU provoque également de nombreux changements morphologiques et physiologiques dans les érythrocytes (Carden & Little, 2019). Le médicament peut augmenter à la fois le nombre et la taille des érythrocytes dans la circulation sanguine, diminuant ainsi le taux d'hémolyse. Une augmentation de la production d'oxyde nitrique (NO) pourrait également être impliquée dans l'effet bénéfique de

l'HU et par conséquent pourrait améliorer le flux sanguin et l'oxygénation des tissus des patients SCD (Gladwin et al., 2003; Kim-Shapiro & Gladwin, 2018).

Cependant, les effets du traitement par l'hydroxyurée sur la microvascularisation, la surface musculaire, et le profil énergétique ne sont que partiellement connus. Compte tenu de l'importance des caractéristiques musculaires sur la forme physique et compte tenu de l'importance de cette dernière sur la qualité de vie des patients SCD, l'évaluation des effets de l'HU sur les caractéristiques musculaires et les mécanismes biologiques sous-jacents et/ou concomitants mériterait d'être approfondie. Dans la présente étude, nous avions l'intention d'évaluer les effets de l'HU sur la microvascularisation, le remodelage du tissu musculaire et de sa fonction, les activités énergétiques et les activités enzymatiques chez la souris.

Matériel et méthode

Modèle animal

Vingtaine-neuf souris Townes HbSS âgées de 2,0 ± 0,5 mois (Jackson Laboratories, Bar Harbord, USA15) ont été évaluées dans le cadre de la présente étude, réalisée conformément aux directives Françaises pour les soins aux animaux et à la Convention Européenne pour la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales et aux directives institutionnelles n° 86/609/CEE 24 novembre 1986. Toutes les expérimentations animales ont été approuvées par le Comité Institutionnel de Protection Animale d'Aix-Marseille Université (numéro d'autorisation n°27800-2020112517474997). Les souris étaient hébergées dans une installation à environnement contrôlé (cycle lumière-obscurité de 12 à 12 h, 22 °C) et ont reçu de l'eau et de la nourriture standard ad libitum. Les souris ont été séparées en deux groupes : un groupe a reçu de l'HU pendant 8 semaines (n = 13, SCD-HU) et un groupe contrôle (n = 16,

SCD) recevant un régime normal pendant la même période. L'HU a été administrée tous les jours (50 mg/kg/jour) dans l'eau des souris et la concentration a été ajustée quotidiennement en fonction de la consommation d'eau des souris.

Conception de l'étude – Biopsies musculaires

Au bout de 8 semaines, les souris alors âgées de 4 mois, ont été anesthésiées dans une chambre d'induction à l'aide d'un flux d'air (3 L/min) contenant 4 % d'isoflurane puis euthanasiées par dislocation cervicale (Equipement vétérinaire Minerve, Esternay, France). Les muscles gastrocnémiens des souris ont été utilisés. Une partie de l'échantillon de biopsie a été montée sur Cryomount® (Histolab, Göteborg, Suède), plongée dans de l'isopentane, congelée dans de l'azote liquide puis stockée au -80° C jusqu'à ce que des analyses histochimiques soient effectuées sur des coupes transversales en série de cryostat de 10 µm d'épaisseur. Le reste de l'échantillon congelé dans de l'azote liquide puis stocké au -80°C a été consacré aux analyses d'activité enzymatique et aux analyses de teneur en protéines musculaires par Western Blots.

Caractéristiques structurelles

Le typage des fibres musculaires a été effectué par analyse histochimique. Le protocole et les colorations utilisés sont identiques à l'étude n°3 sur le modèle murin (voir étude n°3).

Western Blots

Environ 60 mg de muscle ont été broyés avec un mortier et un pilon, immergés dans de l'azote liquide. Le muscle a été homogénéisé dans un tampon RIPA (Abcam; ab156034), un inhibiteur de protéase (Complete EDTA-free; Roche Life Science, Mannheim, Allemagne) et des billes de céramique. Chaque échantillon a été soumis 5 fois à des périodes d'agitation de 10 secondes à 30 Hz (Tissue Lyser II ; Qiagen, Valencia, CA, USA). Ensuite, les homogénats ont

été centrifugés (10 min, 10 000 g, 4°C). Les surnageants ont été collectés en plusieurs aliquotes de 60 µL et utilisés pour l'analyse Western Blots. La concentration en protéines a été mesurée par une méthode colorimétrique (540 nm) avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard (Pierce BCA Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). 30 mg de protéines ont été fractionnés par taille par électrophorèse dans un gel à gradient de 5 à 15 % (Mini-Protean TGX Stain-Free Precast Gels, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) et transférés sur une membrane PVDF (Trans-Blot Turbo Transfer System ; Bio-Rad). Pour le blocage, les transferts ont baigné avec 9 % de lait écrémé et 1 % de BSA sans graisse dans une solution saline tamponnée au Tris (TBS) pendant 2 heures.

Après blocage, les transferts ont été incubés pendant une nuit à 4°C sur un agitateur avec des anticorps primaires spécifiques. Après 5 lavages répétés dans le TBS, les membranes ont été incubées avec des anticorps secondaires appropriés conjugués à la peroxydase (lapin, 1 : 3000) pendant 1 heure à température ambiante. Les membranes ont encore été lavées 5 fois avec du TBS. Les signaux ont été développés par chimiluminescence (substrat de transfert ECL Clarity Western) et surveillés à l'aide du système ChemiDoc XRS +, tous deux de Bio-Rad. L'intensité du signal a été quantifiée par le logiciel Image Lab (Bio-Rad, Laboratories) et a été normalisée par la teneur totale en protéines d'un pool de contrôle.

Les différentes protéines d'intérêt étaient MCT1 (BOSSBS-10249R, 1:500, VWR), MCT2 (ab198272, 1:750, Abcam), MCT4 (ab234728, 1:750, Abcam), CAII (BIRBORB10230 , 1:250; VWR), CAIII (BSBTPA1439, 1:2000, VWR). La quantification a été réalisée par le logiciel Image Lab (Bio-Rad Laboratories).

Réseau microvasculaire

L'analyse morphométrique de la microvascularisation a été réalisée en colorant les capillaires avec l'anticorps CD31 (Dako, Glostrup, Danemark) (Ravelojaona et al., 2015 ; Vincent et al., 2010). Le logiciel fourni par Zeiss a été utilisé pour analyser le réseau microvasculaire. Un champ représentatif a été choisi pour mesurer les paramètres de densité du réseau microvasculaire : densité Capillaire (CD, nombre de capillaires cap/mm^2) et nombre de capillaires en contact avec une seule fibre musculaire (CAF). Dans ce même champ, 90 capillaires ont été analysés pour mesurer les caractéristiques morphologiques des micro-vaisseaux : CapTor, surface capillaire (CSA), périmètre du capillaire (CP) et diamètre extérieur du capillaire (COD) (Ravelojaona et al., 2015). D'autres indices fonctionnels ont également été déterminés, à savoir LC (la longueur de contact entre une fibre musculaire et les capillaires environnants) et le rapport LC/PF (qui indique la surface d'échange entre une fibre musculaire considérée et les capillaires environnants). CAF et LC/PF ont été analysés sans tenir compte de la moyenne de la typologie des fibres.

Activités enzymatiques

Environ 20 mg de muscle ont été homogénéisés dans 400 µL de tampon (Manitol 225 mM, tris HCL 10 mM, saccharose 75 mM, EDTA 0,1 mM) avec un homogénéisateur de tissus (Ultra-Turrax T8 IKA-Werke, Staufen, Allemagne). Les échantillons ont été centrifugés à 4°C pendant 20 minutes (650 g) et le surnageant a été soigneusement collecté. Le culot a été réhomogénéisé dans les 2/3 du tampon précédent et centrifugé une seconde fois avec le surnageant préalablement collecté. La concentration en protéines a été déterminée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard (Kit d'analyse de protéines Pierce BCA, Thermo Scientific, Waltham, MA) et les surnageants ont été stockés à -80°C jusqu'à ce que des analyses ultérieures soient effectuées. Les activités maximales de l'énolase (ENO), de la citrate synthase (CS), de la myokinase (MK), de la créatine kinase (CPK) et de la lactate déshydrogénase (LDH)

ont été déterminées par absorbance avec un lecteur de microplaques multimarques (CLARIOstar, BMG LABTECH GmbH, Allemagne).

Analyses statistiques

Les statistiques descriptives sont exprimées sous forme de moyennes ± écart type (ET). Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Statistica, version 7 (StatSoft, Tulsa, OK, États-Unis). La normalité a été vérifiée avec le test de Shapiro-Wilk. L'ANOVA a été utilisée pour comparer les variables entre les souris SCD et les souris SCD-HU. Les différences ont été considérées comme significatives pour $p < 0,05$ et comme représentant une tendance pour $0,05 \leq p < 0,1$. Les tests post-hoc de Tukey ont été effectués si des effets principaux significatifs et/ou des interactions significatives étaient présents.

Résultats

Mécanismes impliqués dans la régulation du pH

Aucune différence significative n'a été observée pour CAII, CAIII, MCT1, MCT4 et MCT2 (Figure 1) entre les deux groupes de souris SCD et SCD-HU.

*** Insérer la Figure 1***

Analyse histochimique (réseau microvasculaire)

En ce qui concerne les caractéristiques capillaires, les souris SCD- HU ont un diamètre extérieur (COD) plus élevé, une aire de capillaire plus élevée et un périmètre de capillaire plus élevé que les souris SCD ($p = 0.03$, $p = 0.004$ et $p = 0.0008$ respectivement) (Figure 2). En

185 revanche, la densité capillaire (CD, cap.mm^2) et le C/F ne différaient pas entre les souris SCD
186 et les souris SCD-HU.
187 *** Insérer la Figure 2***
188
189 ***Caractéristiques structurales et énergétiques***
190 Concernant les caractéristiques des fibres, les souris SCD ont un périmètre, un diamètre et
191 une aire de fibres oxydatives plus élevés que les souris SCD-HU ($p = 0.004$, $p = 0.006$ et $p =$
192 0.004). Les souris SCD ont un périmètre, un diamètre et une aire de fibres glyco-oxydatives
193 plus élevés que les souris SCD-HU ($p = 0.006$, $p = 0.020$ et $p = 0.025$). Les souris SCD ont plus
194 de fibres oxydatives et moins de fibres glyco-oxydatives que les souris SCD-HU ($p = 0.02$ et p
195 $= 0.03$) (Figure 3).
196 *** Insérer la Figure 3 ***
197
198 Concernant les activités enzymatiques, aucune différence significative n'a été observée
199 pour les enzymes ENO, CS, MK, CPK et LDH entre les deux groupes de souris (Tableau 2).
200 *** Insérer le Tableau 2 ***
201
202
203 **Discussion**
204
205 Le but de la présente étude était de déterminer l'influence de l'HU sur les caractéristiques
206 microvasculaires, structurelles et énergétiques du muscle squelettique chez des souris SCD.
207
208 ***Caractéristiques microvasculaires***

Les différents résultats ont montré que l'HU a un impact significatif sur les caractéristiques microvasculaires uniquement et précisément, sur le COD, le périmètre et la surface du capillaire. Étant donné que l'hydroxyurée est un donneur d'oxyde nitrique (NO) d'une part et que le NO peut induire une hyperémie d'autre part, on peut émettre l'hypothèse que l'élargissement des capillaires pourrait être lié à l'hyperémie liée au traitement HU. En accord avec cette hypothèse, Bosman et al. (Bosman et al., 1995) ont rapporté que l'hyperémie induisait une distension/élargissement capillaire. Une autre étude a observé l'autre face de la même médaille (Kano et al., 2000). En effet, le diamètre luminal capillaire était réduit en réponse à un débit sanguin réduit. Pour expliquer ces résultats et en accord avec la littérature, l'augmentation de la biodisponibilité du NO a été identifiée comme un facteur comptabilisant un potentiel fort. En effet, le flux sanguin local, la résistance à la fatigue et la contractilité des fibres seraient améliorés par la biodisponibilité accrue du NO (Jones et al., 2016). La mesure du NO aurait donc été un plus pour cette étude et aurait permis de confirmer ou non cette hypothèse.

Impact musculaire

L'HU a un impact sur le périmètre, le diamètre et la surface des fibres oxydatives et glyco-oxydatives. Dans une étude récente, Michel et al., 2022 (article en soumission à J Appl Physiol) ont observé que le traitement HU induisait une augmentation de la production de force chez les souris traitées. Cette production de force accrue pourrait être liée à une plus grande quantité relative de fibres à contraction rapide chez les souris sous HU. Dans l'état des connaissances, il est difficile d'expliquer le mécanisme sous-jacent à l'augmentation de la force mise en évidence par Michel et al., 2022 (article en soumission à J Appl Physiol). En effet, les résultats de la présente étude montrent que l'HU n'a aucun impact sur le nombre de fibres glycolytiques mais plutôt sur les fibres glyco-oxydatives, celles-ci pouvant possiblement contribuer à cette

production de force. Par ailleurs, bien que la différence ne soit pas significative, les souris SCD-HU ont tout de même plus de fibres glycolytiques que les souris SCD (Figure 3). Pour apporter des explications à ces résultats, il serait intéressant dans une prochaine étude de mesurer l'activité physique dans la cage des différentes souris (Bowden Davies et al., 2019) pour observer si les souris ayant reçu un traitement HU sont plus actives et par conséquent, d'observer si elles développent davantage leurs capacités physiques, contrairement aux souris contrôle SCD et hyper-sédentaires. Une augmentation de l'activité pourrait conduire à un éventuel remodelage aux niveaux des fibres musculaires, comme il l'est observé ici.

Chez les jeunes patients atteints de drépanocytose, l'efficacité d'un traitement à long terme par hydroxyurée a été déterminée à partir d'une dose moyenne de 26,8 ± 3,2 mg/kg/j pour illustrer des changements hautement significatifs dans de nombreux paramètres de laboratoire : augmentations de l'hémoglobine, du VGM et du pourcentage de HbF, ainsi que des diminutions des réticulocytes, des globules blancs, du nombre absolu de neutrophiles, de la bilirubine totale et de la LDH (Ware, 2010). Pour espérer plus d'effets du médicament sur les souris, il conviendrait de rediscuter des doses à administrer en prenant en considération l'effet cytotoxique de l'HU. En effet, l'effet cytotoxique de l'HU pourrait inhiber ou empêcher le bon fonctionnement des cellules et par conséquent, mener à une diminution de production de cellules immunitaires, masquant les effets bénéfiques initialement supposées de l'hydroxyurée (Brawley et al., 2008; Platt et al., 1984).

De plus, des études ont montré que les effets de l'HU pouvaient être intéressants après 12 mois de traitement et après 18 mois, quelques effets sur la capacité anaérobie sont observés (Hackney et al., 1997). Considérant sur cette étude, les souris ont été prises en charge seulement 8 semaines de traitement, une autre étude avec plus de temps de traitement pourrait être intéressante pour espérer avoir une autre différence.

Au niveau énergétique, les activités enzymatiques n'ont montré aucune différence entre les deux groupes et cette absence de différence reste à ce jour incomprise. En accord avec notre étude, Michel et al., 2022 (article en soumission à J Appl Physiol) ont montré que l'HU n'avait pas modifié de manière significative les évolutions temporelles de la PCr et du pH, ni le métabolisme oxydatif et non oxydatif, suggérant ainsi que l'HU n'a pas eu d'impact sur la bioénergétique musculaire.

Conclusion

Dans la présente étude, les résultats ont montré que l'HU avait un impact sur la taille des micro vaisseaux, possiblement en lien avec une hyperémie réactive au traitement à l'HU. Un autre résultat important de l'étude était la diminution de la surface de section des fibres musculaires (fibres oxydatives et glyco-oxydatives). Des études complémentaires sont nécessaires pour expliquer ces différents résultats.

272 **Tableau**

273

274 **Tableau 1.** Activités des enzymes musculaires chez les souris SCD et les souris SCD-HU.

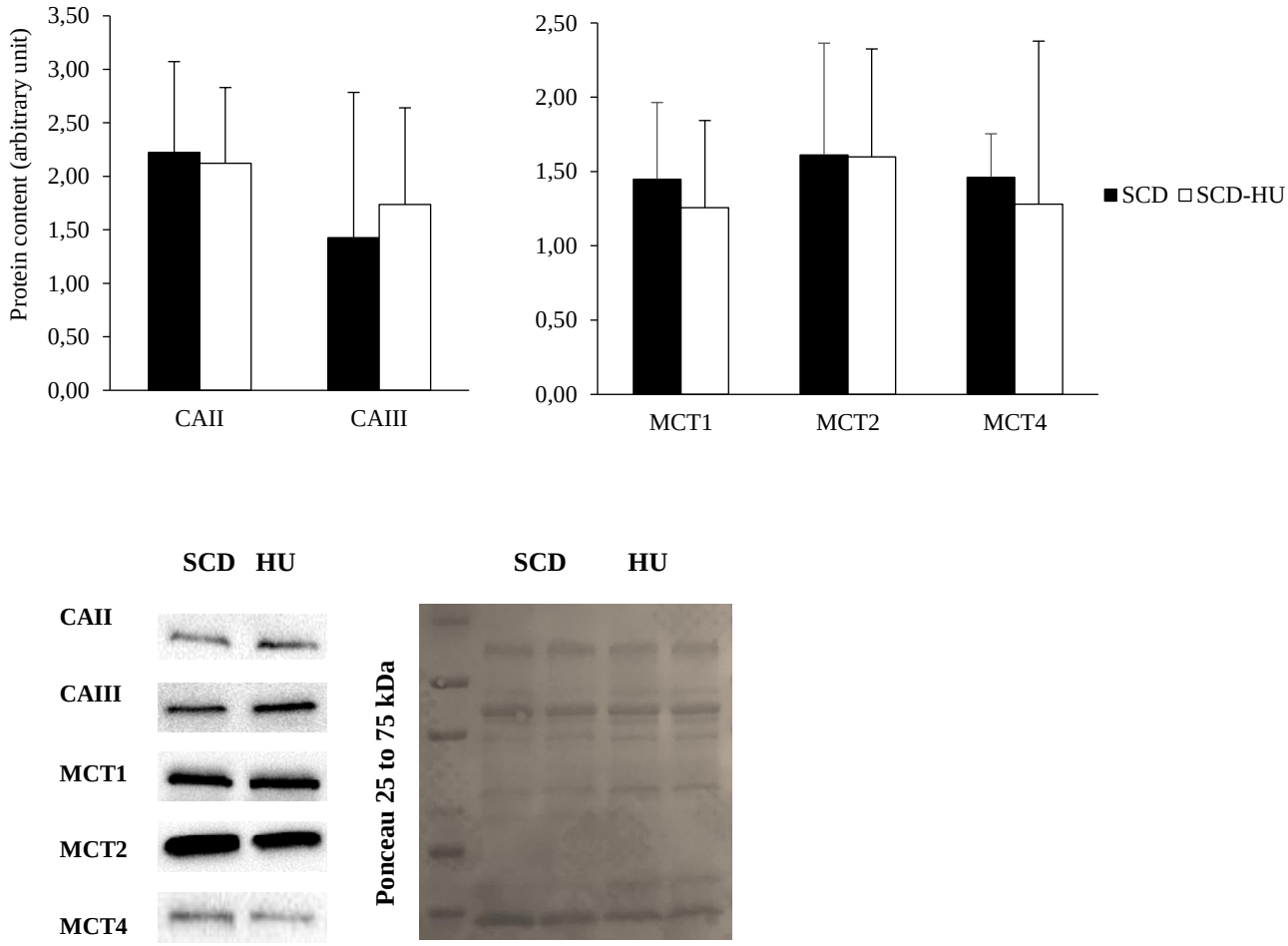
Légendes des figures

Figure 1. Analyse Western blot de CAII et CAIII, MCT1, MCT2 et MCT4 des deux groupes de souris SCD et SCD-HU.

Figure 2. Analyse morphologique des capillaires des deux groupes de souris.

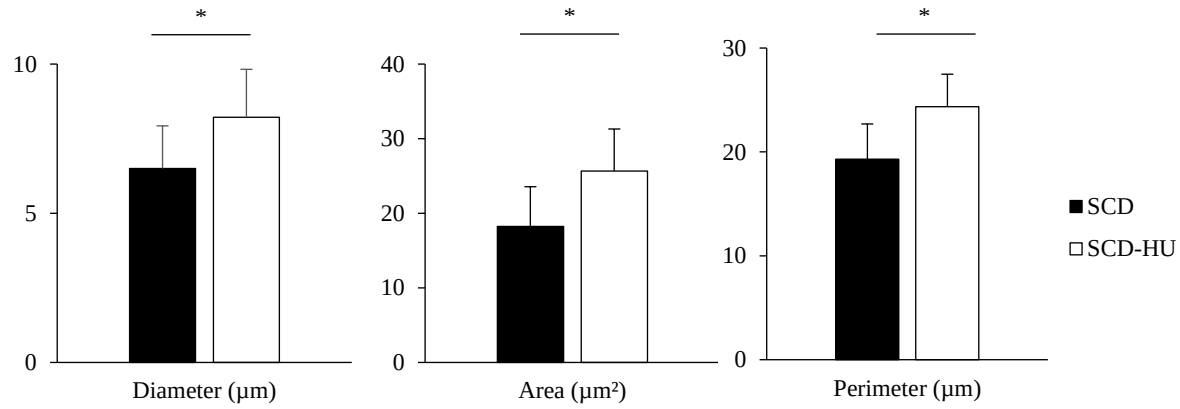
Figure 3. Caractéristiques structurales et énergétiques des deux groupes de souris.

Figure 1. Analyse Western blot de CAII et CAIII, MCT1, MCT2 et MCT4 des deux groupes de souris SCD et SCD-HU.



Les données sont des moyennes ± écart type. CAII : Anhydrase carbonique II (27 kDa). CAIII : Anhydrase carbonique III (29 kDa). MCT1 : Transporteur de monocarboxylate 1 (53 kDa). MCT2 : Transporteur de monocarboxylate 2 (52 kDa). MCT4 : Transporteur de monocarboxylate 4 (49 kDa).

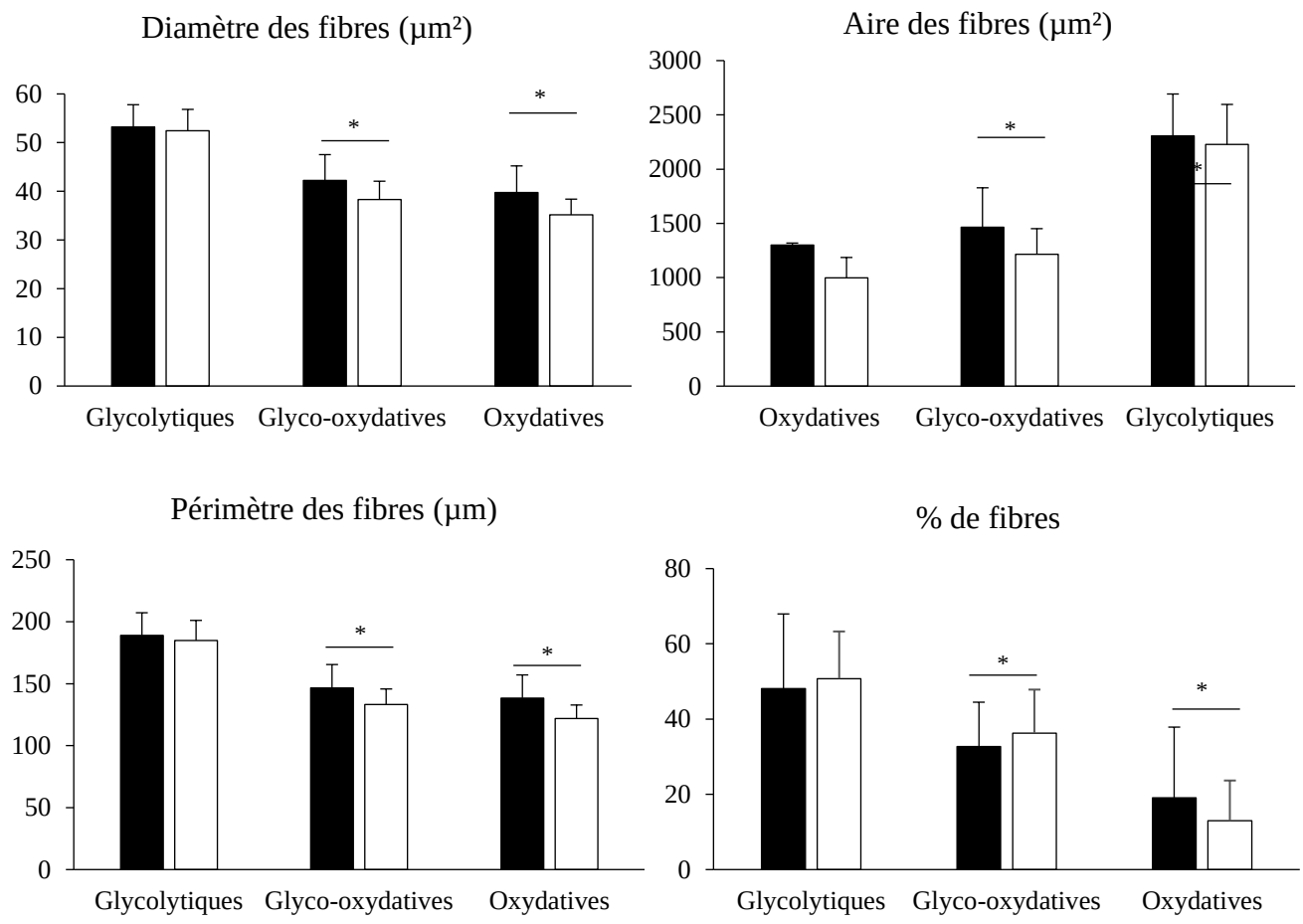
Figure 2. Analyse morphologique des capillaires des deux groupes de souris



Les données sont des moyennes ± écart type.

*correspond à une différence significative avec un $p \leq 0.05$.

310 **Figure 3.** Caractéristiques structurales et énergétiques des deux groupes de souris.



311 Les données sont des moyennes ± écart type. Les barres noires représentent les moyennes du
312 groupe SCD, les barres blanches représentent les moyennes du groupe SCD-HU. *correspond
313 à une différence significative avec un $p \leq 0.05$.

Tableau 1. Activités des enzymes musculaires chez les souris SCD et les souris SCD-HU.

Activités enzymatiques	Souris – SCD (n = 16)		Souris – SCD-HU (n = 13)
ENO (µmol/min/mg)	112.88 ± 32.61	p = 0.5	114.34 ± 49.14
CS (µmol/min/mg)	7.94 ± 2.16	p = 0.1	9.13 ± 2.17
MK (µmol/min/mg)	25.85 ± 7.57	p = 0.1	25.94 ± 6.38
CPK (µmol/min/mg)	23.95 ± 16.18	p = 0.5	29.23 ± 30.42
LDH (µmol/min/mg)	57.31 ± 21.24	p = 0.8	55.43 ± 12.21
Rapport ENO/CS	14.84 ± 4.87	p = 0.4	13.40 ± 5.37

Les données sont des moyennes ± écart type. Abréviations : ENO : Enolase, CS : Citrate Synthase, MK : Myokinase, CPK : Créatine Phosphokinase, LDH : Lactate Déshydrogénase. N = nombre de souris par groupe. P = probabilité statistique, n'indiquant ici aucune différence significative entre les groupes pour les différentes enzymes.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La principale étude de ce projet de thèse, l'étude n°1, avait pour objectif de comparer les caractéristiques microvasculaires et énergétiques des muscles squelettiques de sujets sains féminins et masculins, SCT et SCD. Au vu des données exposées dans la littérature, l'hypothèse émise était telle que le remodelage des muscles squelettiques observé chez les hommes SCT et de SCD serait amoindri chez les femmes SCT er SCD. L'ensemble des résultats obtenus lors de l'étude de Ravelojaona en 2015 (Ravelojaona, 2015) (données démographiques, anthropométriques, hématologiques, microvasculaires, musculaires, structurelles et énergétiques) collectés aux résultats obtenus lors de l'expérimentation de thèse de l'étude n°1 sur les mécanismes impliqués dans la régulation du pH musculaire ont révélé que les femmes présentaient un remodelage microvasculaire spécifique supplémentaire et que la SCD induisait des altérations divergentes de la distribution des types de fibres musculaires. Sur le plan microvasculaire, l'inclusion des femmes dans la population étudiée n'a pas modifié la tendance générale des répercussions du trait drépanocytaire et de la SCD en revanche, la densité du réseau microvasculaire et la surface des micro-vaisseaux sont plus affectés chez les femmes que chez les hommes SCD. Sur le plan énergétique, les activités enzymatiques oxydatives (PFK, LDH, CK, CS, B-HAD et Cox) ne sont pas plus élevées chez les femmes que chez les hommes et quant aux mécanismes impliqués dans la régulation du pH musculaire, aucune différence n'a été observé. Finalement, ces faibles différences structurelles et énergétiques du muscle squelettique entre les deux sexes n'expliquent pas les différences physiologiques observées entre les hommes et les femmes SCD et les répercussions de la maladie dans leur vie quotidienne. Les deux principales explications possibles seraient la différence hormonale entre les deux sexes et éventuellement, une distribution du type de fibres musculaires différentes entre les hommes et les femmes.

L'entraînement en endurance est utilisé dans de nombreuses pathologies en particulier car il permet de corriger les mécanismes de contraction musculaire et de production d'énergie. Dans cette étude n°2 sur les effets de 8 semaines d'entraînement en endurance sur la flexibilité métabolique des patients drépanocytaires, les principaux résultats ont mis en avant que l'entraînement améliorerait le coefficient de pente de la relation $\dot{V}O_2$ vs. le rythme de travail, qu'il atténuerait l'inflexibilité métabolique et enfin qu'il améliorerait certaines fonctions cardio-métaboliques de la réponse post-exercice. Dans ce contexte, un entraînement en

endurance réalisé à une intensité modérée pourrait être une stratégie thérapeutique efficace contre toutes les complications associées à la drépanocytose.

L'étude n°3 avait pour but de comparer les similitudes du remodelage du muscle squelettique entre le modèle murin Townes drépanocytaire et l'Homme SCD. Bien qu'une étude précédente sur l'Homme eût montré un remodelage musculaire et microvasculaire aucune différence n'a été observé chez les souris, saines, porteuses du trait ou drépanocytaire. Ces résultats totalement différents entre les deux populations étudiées questionnent sur les limites du modèle murin et plus particulièrement les souris Townes. En effet, les souris ont vécu pendant 5 mois dans de petites cages qui n'étaient délibérément pas équipées d'une roue, un environnement qui était loin d'être la meilleure représentation de leur habitat naturel. Les souris sont habituées à se déplacer la nuit en faisant plusieurs courtes courses. Dans cette étude, les souris Townes étaient donc hyper-sédentaires, contrairement aux sujets humains dont l'activité quotidienne n'était pas modifiée par l'étude. Cet état hyper-sédentaire des souris a un impact sur le muscle squelettique sur les caractéristiques structurelles et énergétiques, et pourrait noyer la présence de résultats différents entre les groupes de souris sains et malades. Il serait intéressant de refaire une étude en modifiant l'habitat des souris et leur mode de vie durant ces semaines d'expérimentation.

Indépendamment de la pratique sportive, la littérature montre que des stratégies médicamenteuses diverses se développent comme le traitement par hydroxyurée (HU). L'étude n°4 présentée dans ce manuscrit a permis de déterminer l'influence de l'HU sur les caractéristiques microvasculaires, structurelles et énergétiques du muscle squelettique chez des souris SCD. Aucune différence significative n'a été observée pour les caractéristiques structurelles de souris SCD. En revanche, l'HU a diminué le périmètre, le diamètre et la surface des fibres oxydatives et oxy-glycolytiques, et a augmenté différentes caractéristiques microvasculaires (COD, périmètre et aire des capillaires). Étant donné que l'hydroxyurée est un donneur d'oxyde nitrique (NO) et que le NO peut induire une hyperémie, l'hypothèse que l'élargissement des capillaires pourrait être lié à l'hyperémie liée au traitement HU peut être émise. Considérant que pour cette étude, les souris n'ont été prises en charge que pendant 4 mois de traitement, une autre étude avec plus de temps de traitement pourrait être intéressante pour espérer avoir d'autre différence.

Ces différentes études sur la drépanocytose mettent en lumière plusieurs perspectives. Tout d'abord, la comparaison entre les hommes et les femmes drépanocytaires et porteurs du trait, montrent que les différences dans les répercussions de la maladie chez les deux sexes ne peuvent être associées à des différences dans le remodelage musculaire, qu'il soit microvasculaire, ou énergétique. Deux explications sont alors possibles. Les différences entre les hommes et les femmes SCD et SCT peuvent être associées aux différences hormonales entre les deux sexes, ou bien, de par la répartition des fibres musculaires chez chacun des deux sexes. Des études complémentaires mettant en avant ces deux possibilités seraient nécessaires.

Ces différentes études de thèse ont mis en avant les effets bénéfiques du travail en endurance à intensité modérée chez les patients drépanocytaires. Néanmoins, et pour faire le lien avec l'étude n°4, une association entre entraînement en endurance et traitement par hydroxyurée pourrait être envisageable chez les patients drépanocytaires afin d'espérer davantage d'effets bénéfiques des deux stratégies combinées. En d'autres termes, et pour reprendre les éléments de la littérature, l'entraînement en endurance associé à l'hydroxyurée pourrait conduire à une augmentation de l'oxygénation et améliorer la fonction énergétique, par la suite, sortir les patients du cercle vicieux dans lequel ils sont contraints. Par ailleurs, la durée d'entraînement de 8 semaines a largement fait ses preuves dans des études précédentes chez les patients drépanocytaires. Envisager un programme d'entraînement sur du plus long terme serait encore mieux notamment pour éviter tout événements indésirables dans le quotidien des patients drépanocytaires telles que les crises vaso-occlusives et tous les processus physiopathologiques associés. Pour cela, il serait idéal d'éduquer les patients à la pratique de ce genre d'effort d'endurance à intensité modérée, les conduire à des plans d'entraînements individualisés et surtout, suivi par des professionnels du milieu.

Bien que le modèle de souris Townes soit le plus complet et le plus proche de l'Homme pour étudier la drépanocytose, il est évident qu'il existe des limites. En effet, l'absence de remodelage microvasculaire et énergétique chez la souris Townes drépanocytaire questionne sur l'utilisation des souris dans l'étude de ces différentes caractéristiques musculaires notamment dans l'étude de stratégie thérapeutique telle que l'utilisation de l'hydroxyurée.

L'étude réalisée au cours de cette thèse a apporté des informations sur les réponses du muscle squelettique après avoir suivi un traitement thérapeutique. L'intervention thérapeutique sous hydroxyurée établie sur 8 semaines a permis d'obtenir un remodelage microvasculaire

chez les souris drépanocytaires cependant, pour espérer voir d'autres effets sur le muscle squelettique et de ce fait par la suite, pour espérer améliorer le quotidien des patients drépanocytaires, il semble important de prolonger la durée du traitement et peut-être même augmenter la dose administrée. D'autres associations sont encore envisageables pour déterminer l'approche optimale dans la prise en charge physique des patients drépanocytaires comme l'entraînement combiné à la prise d'HU mais aussi, la prise d'autres traitements complémentaires (GBT440 ou Crizanlizumab). La fonction musculaire et le métabolisme énergétique pourrait être améliorés avec principalement, une augmentation de l'oxygénation tissulaire.

Ces deux études, étude n°3 et étude n°4 se limite à l'étude de modèle pré-clinique, et par rapport à toutes les raisons évoquées précédemment sur les limites du modèle murin, il serait nécessaire de transférer ces interventions chez l'Homme

REFERENCES

Abe, H. (2000). Role of Histidine-Related Compounds as Intracellular Proton Buffering Constituents in Vertebrate Muscle. *Biochemistry (Moscow)*, *65*(7), 757–765.

Adachi, K., & Asakura, T. (1984). Polymerization of AS hybrid hemoglobin. Potent inhibitory effect of hemoglobin A on the polymerization of AS hybrid hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, *259*(4), 2108–2112. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)43323-0

Aggel-Leijssen, D., Saris, W., Wagenmakers, A. J. M., Hul, G., & Baak, M. (2001). The Effect of Low-Intensity Exercise Training on Fat Metabolism of Obese Women. *Obesity Research*, *9*.

Aggel-Leijssen, D., Saris, W., Wagenmakers, A. J. M., Senden, J., & Baak, M. (2002). Effect of exercise training at different intensities on fat metabolism of obese men. *J Appl Physiol*, 1300–1309.

Agrawal, R., Patel, R., Shah, V., Nainiwal, L., & Trivedi, B. (2014). Hydroxyurea in sickle cell disease: Drug review. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, *30*(2), 91–96. https://doi.org/10.1007/s12288-013-0261-4

Ahmed, S., Shahid, R. K., & Russo, L. A. (2005). Unusual causes of abdominal pain: Sickle cell anemia. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, *19*(2 SPEC. ISS.), 297–310. https://doi.org/10.1016/j.bpg.2004.11.007

Akinlade, K. S., Kumuyi, A. S., Rahamon, S. K., & Olaniyi, J. A. (2018). Insulin Sensitivity, Inflammation, and Basal Metabolic Rate in Adults with Sickle Cell Anemia. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, *8*(2), 193–195. https://doi.org/10.4103/ijabmr.IJABMR

Allison, A. C. (1954). Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *British Medical Journal*, *1*(4857), 290–294. https://doi.org/10.1136/bmj.1.4857.290

Almomen, A. W., Tawfeeq, Y. M., Almuhaisin, A. K., & Altalib, A. A. (2020). Myonecrosis in a Sickle Cell-Diseased Patient: A Case Report and Literature Review. *Case Reports in Orthopedics*, *2020*(Figure 1), 1–5. https://doi.org/10.1155/2020/3189645

Alsaied, T., Niss, O., Powell, A. W., Fleck, R. J., Cnota, J. F., Chin, C., Malik, P., Quinn, C. T., & Taylor, M. D. (2018). Diastolic dysfunction is associated with exercise impairment in patients with sickle cell anemia. *Pediatric Blood and Cancer*, *65*(8), 1–8.

https://doi.org/10.1002/pbc.27113

Alsultan, A. I., Seif, M. A., Amin, T. T., Naboli, M., & Alsuliman, A. M. (2010). Ferritin and Insulin Resistance in Sickle Cell Disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 527–538.

Ameringer, S., Elswick, J. K., & Smith, W. (2014). Fatigue in Adolescents and Young Adults With Sickle Cell Disease: Biological and Behavioral Correlates and Health-Related Quality of Life. *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, *31*(1), 6–17. https://doi.org/10.1177/1043454213514632

Andersen, P., & Henriksson, J. (1977). Capillary Supply of the quadriceps femoris muscle of man : adaptive response to exercise. *J. Physiol*, 677–690.

Angelucci, E., Matthes-Martin, S., Baronciani, D., Bernaudin, F., Bonanomi, S., Cappellini, M. D., Dalle, J. H., Di Bartolomeo, P., de Heredia, C. D., Dickerhoff, R., Giardini, C., Gluckman, E., Hussein, A. A., Kamani, N., Minkov, M., Locatelli, F., Rocha, V., Sedlacek, P., Smiers, F., … Peters, C. (2014). Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia major and sickle cell disease: Indications and management recommendations from an international expert panel. *Haematologica*, *99*(5), 811–820. https://doi.org/10.3324/haematol.2013.099747

Anthi, A., Machado, R. F., Jison, M. L., Taveira-dasilva, A. M., Rubin, L. J., Hunter, L. A., Hunter, C. J., Coles, W., Nichols, J., Avila, N. A., Sachdev, V., Chen, C. C., & Gladwin, M. T. (2007). Hemodynamic and Functional Assessment of Patients with Sickle Cell Disease and Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. https://doi.org/10.1164/rccm.200610-1498OC

Ataga, K. I., Kutlar, A., Kanter, J., Liles, D., Cancado, R., Friedrisch, J., Guthrie, T. H., Knight-Madden, J., Alvarez, O. A., Gordeuk, V. R., Gualandro, S., Colella, M. P., Smith, W. R., Rollins, S. A., Stocker, J. W., & Rother, R. P. (2017). Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, *376*(5), 429–439. https://doi.org/10.1056/nejmoa1611770

Aufradet, E., Douillard, A., Charrin, E., Romdhani, A., De Souza, G., Bessaad, A., Faes, C., Bourgeaux, V., Chirico, E. N., Canet-Soulas, E., Pialoux, V., & Martin, C. (2014). Physical activity limits pulmonary endothelial activation in sickle cell SAD mice. *Blood*, *123*(17), 2745–2748.

Babiker, A. O., & Kaddam, L. A. (2018). Risk factors of metabolic syndrome among adult Sudanese sickle cell anemia patients. *BMC Hematology*, *18*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/s12878-018-0110-7

Balayssac-Siransy, E., Connes, P., Tuo, N., Danho, C., Diaw, M., Sanogo, I., Hardy-Dessources, M. D., Samb, A., Ballas, S. K., & Bogui, P. (2011). Mild haemorheological changes induced by a moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, *154*(3), 398–407. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08728.x

Balkaran, B., Char, G., Morris, J. S., Thomas, P. W., Serjeant, B. E., & Serjeant, G. R. (1992). Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease. *The Journal of Pediatrics*, *120*(3), 360–366. https://doi.org/10.1016/S0022-3476(05)80897-2

Ballas, S. K., McCarthy, W. F., Guo, N., DeCastro, L., Bellevue, R., Barton, B. A., & Waclawiw, M. A. (2009). Exposure to hydroxyurea and pregnancy outcomes in patients with sickle cell anemia. *Journal of the National Medical Association*, *101*(10), 1046–1051. https://doi.org/10.1016/S0027-9684(15)31072-5

Ballas, S. K., Pulte, D. E., Lobo, C., & Riddick-Burden, G. (2016). Case series of octogenarians with sickle cell disease. *Blood*, *128*(19), 2367–2370.

Bankolé, L. C., Millet, G. Y., Temesi, J., Bachasson, D., Ravelojaona, M., Wuyam, B., Verges, S., Ponsot, E., Antoine, J. C., Kadi, F., & Féasson, L. (2016). Safety and efficacy of a 6-month home-based exercise program in patients with facioscapulohumeral muscular dystrophy: A randomized controlled trial. *Medicine (United States)*, *95*(31), 1–10. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004497

Baron, A. D. (1994). Hemodynamic actions of insulin. In *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* (Vol. 267, Issue 2, pp. 30 – 2). https://doi.org/10.1152/ajpendo.1994.267.2.e187

Bartolucci, P., Habibi, A., Khellaf, M., Roudot-Thoraval, F., Melica, G., Lascaux, A. S., Moutereau, S., Loric, S., Wagner-Ballon, O., Berkenou, J., Santin, A., Michel, M., Renaud, B., Lévy, Y., Galactéros, F., & Godeau, B. (2016). Score Predicting Acute Chest Syndrome During Vaso-occlusive Crises in Adult Sickle-cell Disease Patients. *EBioMedicine*, *10*, 305–311. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.038

Baum, K. F., Dunn, D. T., Maude, G. H., & Serjeant, G. R. (1987). The Painful Crisis of Homozygous Sickle Cell Disease: A Study of Risk Factors. *Archives of Internal Medicine*, *147*(7), 1231–1234. https://doi.org/10.1001/archinte.1987.00370070045007

Baum, O., Gübeli, J., Frese, S., Torchetti, E., Malik, C., Odriozola, A., Graber, F., Hoppeler, H., & Tschanz, S. A. (2015). Angiogenesis-related ultrastructural changes to capillaries in human skeletal muscle in response to endurance exercise. *Journal of Applied Physiology*, *119*(10), 1118–1126. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00594.2015

Beaver, W. L., Wasserman, K., & Whipp, B. J. (1985). Bicarbonate buffering of lactic acid generated during exercise. *Journal of Applied Physiology*, *60*(2), 472–478. https://doi.org/10.1152/jappl.1986.60.2.472

Becker, H. M., Bröer, S., & Deitmer, J. W. (2004). Facilitated Lactate Transport by MCT1 When Coexpressed with the Sodium Bicarbonate Cotransporter (NBC) in Xenopus Oocytes. *Biophysical Journal*, *86*(1 I), 235–247. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74099-0

Becker, H. M., & Deitmer, J. W. (2007). Carbonic Anhydrase II Increases the Activity of the Human Electrogenic Na+/ HCO-3. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(18), 13508–13521. https://doi.org/10.1074/jbc.M700066200

Becker, H. M., & Deitmer, J. W. (2008). Nonenzymatic Proton Handling by Carbonic Anhydrase II during +-Lactate Cotransport via Monocarboxylate Transporter 1*. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(31), 21655–21667. https://doi.org/10.1074/jbc.M802134200

Becker, H. M., Hirnet, D., Fecher-Trost, C., Süitemeyer, D., & Deitmer, J. W. (2005). Transport activity of MCT1 expressed in xenopus oocytes is increased by interaction with carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(48), 39882–39889. https://doi.org/10.1074/jbc.M503081200

Becker, H. M., Klier, M., & Deitmer, J. W. (2010). Nonenzymatic Augmentation of Lactate Transport via Monocarboxylate Transporter Isoform 4 by Carbonic Anhydrase II. *J Membrane Biol*, 125–135. https://doi.org/10.1007/s00232-010-9240-y

Beier, M., Bombardier, C. H., Hartoonian, N., Motl, R. W., & Kraft, G. H. (2014). Improved physical fitness correlates with improved cognition in multiple sclerosis. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, *95*(7), 1328–1334. https://doi.org/10.1016/j.apmr.2014.02.017

Belcher, J. D., Bryant, C. J., Nguyen, J., Bowlin, P. R., Kielbik, M. C., Bischof, J. C., Hebbel, R. P., & Vercellotti, G. M. (2003). Transgenic sickle mice have vascular inflammation. *Blood*, *101*(10), 3953–3959. https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3313

Belcher, J. D., Chunsheng, C., Nguyen, J., Milbauer, L., Abdulla, F., Alayash, A. I., Smith, A., Nath, K. A., Hebbel, R. P., & Vercellotti, G. M. (2014). Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood*, *123*(3), 377–390. https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-495887

Benjamini, Y. (2010). Discovering the false discovery rate. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B: Statistical Methodology*, *72*(4), 405–416.

https://doi.org/10.1111/j.1467-9868.2010.00746.x

Bergeron, M. F., Cannon, J. G., Hall, E. L., & Kutlar, A. (2004). Erythrocyte sickling during exercise and thermal stress. *Clinical Journal of Sport Medicine*, *14*(6), 354–356. https://doi.org/10.1097/00042752-200411000-00005

Bernaudin, F., Socie, G., Kuentz, M., Chevret, S., Duval, M., Bertrand, Y., Vannier, J. P., Yakouben, K., Thuret, I., Bordigoni, P., Fischer, A., Lutz, P., Stephan, J. L., Dhedin, N., Plouvier, E., Margueritte, G., Bories, D., Verlhac, S., Esperou, H., … Gluckman, E. (2007). Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. *Blood*, *110*(7), 2749–2756. https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-079665

Berthaut, I., Guignedoux, G., Kirsch-Noir, F., De Larouziere, V., Ravel, C., Bachir, D., Galactéros, F., Ancel, P. Y., Kunstmann, J. M., Levy, L., Jouannet, P., Girot, R., & Mandelbaum, J. (2008). Influence of sickle cell disease and treatment with hydroxyurea on sperm parameters and fertility of human males. *Haematologica*, *93*(7), 988–993. https://doi.org/10.3324/haematol.11515

Beuzard, Y. (2008). Mouse models of sickle cell disease. *Transfusion Clinique et Biologique*, *15*(1–2), 7–11. https://doi.org/10.1016/j.tracli.2008.04.001

Bhatia, M., & Walters, M. C. (2008). Hematopoietic cell transplantation for thalassemia and sickle cell disease: Past, present and future. *Bone Marrow Transplantation*, *41*(2), 109–117. https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705943

Bielak, A. A. M., Cherbuin, N., Bunce, D., & Anstey, K. J. (2014). Preserved differentiation between physical activity and cognitive performance across young, middle, and older adulthood over 8 years. *Journals of Gerontology - Series B Psychological Sciences and Social Sciences*, *69*(4), 523–532. https://doi.org/10.1093/geronb/gbu016

Bilé, A., Le Gallais, D., Mercier, B., Martinez, P., Ahmaidi, S., & Préfaut, C. (1996). Anaerobic exercise components during the force-velocity test in Sickle cell trait. *International Journal of Sports Medicine*, *17*(4), 254–258. https://doi.org/10.1055/s-2007-972842

Bilé, A., Le Gallais, D., Mercier, J., Bogui, J., & Préfaut, C. (1998). Sickle Cell Trait in lvory Coast Athletic Throw and Jump Champions, 1956 - 1995. *Orthopaedics and Clinical Science*, *8*, 1–5.

Böning, D., & Strobel, G. (2005). Lactic Acid Still Remains the Real Cause of Exercise-Induced Metabolic Acidosis. *American Physiological Society*, *6*(5), 1401–1402. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00069.2005.The

Bookchin, R. M., Balazs, T., & Landau, L. C. (1976). Determinants of red cell sickling. Effects of varying pH and of increasing intracellular hemoglobin concentration by osmotic shrinkage. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *87*, 597–616.

Borghouts, L. B., Backx, K., Mensink, M. F., & Keizer, H. A. (1999). Effect of training intensity on insulin sensitivity as evaluated by insulin tolerance test. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, *80*(5), 461–466. https://doi.org/10.1007/s004210050618

Bosman, J., Tangelder, G. J., Egbrink, M. G. A. O., Reneman, R. S., & Slaaf, D. W. (1995). Capillary diameter changes during low perfusion pressure and reactive hyperemia in rabbit skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *269*(3 38-3). https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.269.3.h1048

Bottinelli, R., Pellegrino, M. A., Canepari, M., Rossi, R., & Reggiani, C. (1999). Specific contributions of various muscle fibre types to human muscle performance: An in vitro study. *Journal of Electromyography and Kinesiology*, *9*(2), 87–95. https://doi.org/10.1016/S1050-6411(98)00040-6

Bowden Davies, K. A., Pickles, S., Sprung, V. S., Kemp, G. J., Alam, U., Moore, D. R., Tahrani, A. A., & Cuthbertson, D. J. (2019). Reduced physical activity in young and older adults: metabolic and musculoskeletal implications. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, *10*, 1–15. https://doi.org/10.1177/2042018819888824

Brawley, O. W., Cornelius, L. J., Edwards, L. R., Northington Gamble, V., Green, B. L., Inturrisi, C., James, A. H., Laraque, D., Mendez, M., Montoya, C. J., Pollock, B. H., Robinson, L., Scholnik, A. P., & Schori, M. (2008). National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: Hydroxyurea treatment for sickle cell disease. *Annals of Internal Medicine*, *148*(12), 932–938. https://doi.org/10.7326/0003-4819-148-12-200806170-00220

Briehl, R. W., & Ewert, S. (1973). Effects of pH, 2,3-diphosphoglycerate and salts on gelation of sickle cell deoxyhemoglobin. *Journal of Molecular Biology*, *80*(3), 445–458. https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90415-4

Brooks, G. A., & Mercier, J. (1994). Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: The "crossover" concept. *Journal of Applied Physiology*, *76*(6), 2253–2261. https://doi.org/10.1152/jappl.1994.76.6.2253

Browning, R. C., Baker, E. A., Herron, J. A., & Kram, R. (2006). Effects of obesity and sex on the energetic cost and preferred speed of walking. *Journal of Applied Physiology*, *100*(2), 390–398. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00767.2005

Buchheit, M., Simon, C., Piquard, F., Ehrhart, J., & Brandenberger, G. (2004). Effects of increased training load on vagal-related indexes of heart rate variability: A novel sleep approach. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *287*(6), 56–6. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00490.2004

Buchowski, M. S., Townsend, K. M., Williams, R., & Chen, K. Y. (2002). Patterns and energy expenditure of free-living physical activity in adolescents with sickle cell anemia. *Journal of Pediatrics*, *140*(1), 86–92. https://doi.org/10.1067/mpd.2002.120689

Bunn, H. F. (1997). Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. *The New England Journal of Medicine*, *337*, 762–769.

Bush, A. M., Coates, T. D., & Wood, J. C. (2018). Diminished cerebral oxygen extraction and metabolic rate in sickle cell disease using T2 relaxation under spin tagging MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*, *80*(1), 294–303. https://doi.org/10.1002/mrm.27015

Callahan, L. A., Woods, K. F., Mensah, G. A., Ramsey, L. T., Barbeau, P., & Gutin, B. (2002). Cardiopulmonary responses to exercise in women with sickle cell anemia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *165*(9), 1309–1316. https://doi.org/10.1164/rccm.2002036

Camcıoğlu, B., Boşnak-Güçlü, M., Karadallı, M. N., Akı, Ş. Z., & Türköz-Sucak, G. (2015). The Role of Inspiratory Muscle Training in Sickle Cell Anemia Related Pulmonary Damage due to Recurrent Acute Chest Syndrome Attacks. *Case Reports in Hematology*, *2015*, 1–6. https://doi.org/10.1155/2015/780159

Campbell, A., Minniti, C. P., Nouraie, M., Arteta, M., Rana, S., Onyekwere, O., Sable, C., Ensing, G., Dham, N., Luchtman-Jones, L., Kato, G. J., Gladwin, M. T., Castro, O., & Gordeuk, V. R. (2009). Prospective evaluation of haemoglobin oxygen saturation at rest and after exercise in paediatric sickle cell disease patients. *British Journal of Haematology*, *147*(3), 352–359. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07854.x

Cancado, R. D., Olivato, M. C. A., Filho, N. N. L., Campos, O., & Chiattone, C. (2008). Pulmonary Hypertension as a Risk Factor for Death in Patients with Sickle Cell Anemia. *Blood*, *112*(11), 4819–4819. https://doi.org/10.1182/blood.v112.11.4819.4819

Carden, M. A., & Little, J. (2019). Emerging disease-modifying therapies for sickle cell disease. *Haematologica*, *104*(9), 1710–1719. https://doi.org/10.3324/haematol.2018.207357

Castellino, S. M., Combs, M. R., Zimmerman, S. A., Issitt, P. D., & Ware, R. E. (1999). Erythrocyte autoantibodies in paediatric patients with sickle cell disease receiving transfusion therapy: Frequency, characteristics and significance. *British Journal of*

Haematology, *104*(1), 189–194. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01127.x

Charache, S., Dover, G. J., Moore, R. D., Eckert, S., Ballas, S. K., Koshy, M., Milner, P. F. A., Orringer, E. P., Phillips, G., Platt, O. S., & Thomas, G. H. (1992). Hydroxyurea: Effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood*, *79*(10), 2555–2565. https://doi.org/10.1182/blood.v79.10.2555.2555

Charache, S., Terrin, M. L., Moore, R. D., Dover, G. J., Barton, F. B., Eckert, S. V., McMahon, R. P., & Bonds, D. R. (1995). Effect of Hydroxyurea on the Frequency of Painful Crises in Sickle Cell Anemia. *New England Journal of Medicine*, *332*(20), 1317–1322. https://doi.org/10.1056/nejm199505183322001

Charifi, N., Kadi, F., Féasson, L., Costes, F., Geyssant, A., & Denis, C. (2004). Enhancement of microvessel tortuosity in the vastus lateralis muscle of old men in response to endurance training. *Journal of Physiology*, *554*(2), 559–569. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.046953

Charrin, E. (2017). *Étude des mécanismes impliqués dans l ' inflammation , le stress oxydant et le métabolisme de l ' oxyde nitrique chez des souris transgéniques drépanocytaires : approches sportive et pharmacologique Emmanuelle Charrin To cite this version : HAL Id : tel-0*.

Charrin, E., Dubé, J. J., Connes, P., Pialoux, V., Ghosh, S., Faes, C., Ofori-Acquah, S. F., & Martin, C. (2018). Moderate exercise training decreases inflammation in transgenic sickle cell mice. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *69*(June), 45–52. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.06.002

Charrin, E., Ofori-Acquah, S. F., Nader, E., Skinner, S., Connes, P., Pialoux, V., Joly, P., & Martin, C. (2016). Inflammatory and oxidative stress phenotypes in transgenic sickle cell mice. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *62*, 13–21. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2016.10.020

Chatel, B. (2017). *Benjamin CHATEL*.

Chatel, B., Bendahan, D., Hourdé, C., Pellerin, L., Lengacher, S., Magistretti, P., Le Fur, Y., Vilmen, C., Bernard, M., & Messonnier, L. A. (2017). Role of MCT1 and CAII in skeletal muscle pH homeostasis, energetics, and function: In vivo insights from MCT1 haploinsufficient mice. *FASEB Journal*, *31*(6), 2562–2575. https://doi.org/10.1096/fj.201601259R

Chatel, B., Messonnier, L. A., Barge, Q., Vilmen, C., Noirez, P., Bernard, M., Pialoux, V., & Bendahan, D. (2018). Endurance training reduces exercise-induced acidosis and improves muscle function in a mouse model of sickle cell disease. *Molecular Genetics*

and Metabolism, *123*(3), 400–410. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.11.010

Chatel, B., Messonnier, L. A., & Bendahan, D. (2018). Do we have to consider acidosis induced by exercise as deleterious in sickle cell disease? *Experimental Physiology*, *103*(9), 1213–1220. https://doi.org/10.1113/EP087169

Chatel, B., Messonnier, L. A., Hourdé, C., Vilmen, C., Bernard, M., & Bendahan, D. (2017). Moderate and intense muscular exercises induce marked intramyocellular metabolic acidosis in sickle cell disease mice. *Journal of Applied Physiology*, *122*(5), 1362–1369. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01099.2016

Chaves, M. A. F., Leonart, M. S. S., & do Nascimento, A. J. (2008). Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. *Hematology*, *13*(3), 187–192. https://doi.org/10.1179/102453308X343356

Chirico, E. N., Faës, C., Connes, P., Canet-Soulas, E., Martin, C., & Pialoux, V. (2016). Role of Exercise-Induced Oxidative Stress in Sickle Cell Trait and Disease. *Sports Medicine*, *46*(5), 629–639. https://doi.org/10.1007/s40279-015-0447-z

Chirico, E. N., Martin, C., Faës, C., Féasson, L., Oyono-Enguéllé, S., Aufradet, E., Dubouchaud, H., Francina, A., Canet-Soulas, E., Thiriet, P., Messonnier, L. A., & Pialoux, V. (2012). Exercise training blunts oxidative stress in sickle cell trait carriers. *Journal of Applied Physiology*, *112*(9), 1445–1453. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01452.2011

Chirico, E. N., & Pialoux, V. (2012). Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life*, *64*(1), 72–80. https://doi.org/10.1002/iub.584

Christov, C., Chrétien, F., Abou-Khalil, R., Bassez, G., Vallet, G., Authier, F. J., Bassaglia, Y., Shinin, V., Tajbakhsh, S., Chazaud, B., & Gherardi, R. K. (2007). Muscle Satellite Cells and Endothelial Cells: Close neighbors and privileged partners. *Molecular Biology of the Cell*, *18*(December), 986–994. https://doi.org/10.1091/mbc.E06

Clark, M. R., Guatelli, J. C., Mohandas, N., & Shohet, S. B. (1980). Influence of Red Cell Water Content on the Morphology of Sickling. *Blood*.

Claster, S., Godwin, M. J., Embury, S. H., & Francisco, S. (1981). Risk of Altitude Exposure in Sickle Cell Disease. *The Western Journal of Medicine*, 364–367.

Cokic, V. P., Smith, R. D., Beleslin-Cokic, B. B., Njoroge, J. M., Miller, J. L., Gladwin, M. T., & Schechter, A. N. (2003). Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *Journal of Clinical Investigation*, *111*(2), 231–239. https://doi.org/10.1172/JCI200316672

Connes, P., MacHado, R. F., & Hue, O. (2011). Exercise limitation, exercise testing and

exercise recommendations in sickle cell anemia. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, *49*(1–4), 151–163. https://doi.org/10.3233/CH-2011-1465

Connes, P., Sara, F., Hardy-Dessources, M. D., Marlin, L., Etienne, F., Larifla, L., Saint-Martin, C., & Hue, O. (2006). Effects of short supramaximal exercise on hemorheology in sickle cell trait carriers. *European Journal of Applied Physiology*, *97*(2), 143–150. https://doi.org/10.1007/s00421-006-0155-3

Connes, P., Simmonds, M. J., Brun, J. F., & Baskurt, O. K. (2013). Exercise hemorheology: Classical data, recent findings and unresolved issues. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, *53*(1–2), 187–199. https://doi.org/10.3233/CH-2012-1643

Coote, J. H. (2010). Recovery of heart rate following intense dynamic exercise. *Experimental Physiology*, *95*(3), 431–440. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.047548

Cotman, C. W., & Berchtold, N. C. (2002). Exercise: A behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neurosciences*, *25*(6), 295–301. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02143-4

Darland, D. C., Massingham, L. J., Smith, S. R., Piek, E., Saint-Geniez, M., & D'Amore, P. A. (2003). Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Developmental Biology*, *264*(1), 275–288. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.08.015

Davies, S. W., Jordan, S. L., & Lipkin, D. P. (1992). *Use of Limb Movement Sensors as Indicators of the Level of Everyday Physical Activity in Chronic Congestive Heart Failure*. 1581–1586.

Dehn, M. M., & Bruce, R. A. (1972). Longitudinal variations in maximal oxygen intake with age and activity. *Journal of Applied Physiology*, *33*(6), 805–807. https://doi.org/10.1152/jappl.1972.33.6.805

Delclaux, C., Zerah-Lancner, F., Bachir, D., Habibi, A., Monin, J. L., Godeau, B., & Galactéros, F. (2005). Factors associated with dyspnea in adult patients with sickle cell disease. *Clinical Investigations*, *128*(5), 3336–3344. https://doi.org/10.1378/chest.128.5.3336

Denis, C., Chatard, J. C., Dormois, D., Linossier, M. T., Geyssant, A., & Lacour, J. R. (1986). Effects of endurance training on capillary supply of human skeletal muscle on two age groups (20 and 60 years). *Journal of Physiology (Paris)*, 379–383.

Detterich, J. A., Kato, R., Bush, A., Chalacheva, P., Ponce, D., De Zoysa, M., Shah, P., Khoo, M. C., Meiselman, H. J., Coates, T. D., & Wood, J. C. (2019). Sickle Cell Microvascular Paradox – oxygen supply-demand mismatch. *Am J Hematol*.

https://doi.org/10.1002/ajh.25476

Di Giovanni, S., Mirabella, M., Papacci, M., Odoardi, F., Silvestri, G., & Servidei, S. (2001). Apoptosis and ROS detoxification enzymes correlate with cytochrome c oxidase deficiency in mitochondrial encephalomyopathies. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *17*(4), 696–705. https://doi.org/10.1006/mcne.2001.0970

Dincer, H. E. et al. (2005). Compartment syndrome and fatal rhabdomyolysis in sickle cell trait. *Wisconsin Medical Journal*, *104*(6), 67–71.

Dover, G. J., Smith, K. D., Chang, Y. C., Purvis, S., Mays, A., Meyers, D. A., Sheils, C., & Serjeant, G. (1992). Fetal hemoglobin levels in sickle cell disease and normal individuals are partially controlled by an X-linked gene located at Xp22.2. *Blood*, *80*(3), 816–824. https://doi.org/10.1182/blood.v80.3.816.bloodjournal803816

Dufu, K., & Oksenberg, D. (2018). GBT440 reverses sickling of sickled red blood cells under hypoxic conditions in vitro. *Hematology Reports*, *10*(2), 1–9. https://doi.org/10.4081/hr.2018.7419

Dufu, K., Williams, A. T., Muller, C. R., Walser, C. M., Lucas, A., Eaker, A. M., Alt, C., Cathers, B. E., Oksenberg, D., & Cabrales, P. (2021). Increased hemoglobin affinity for oxygen with GBT1118 improves hypoxia tolerance in sickle cell mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *321*(2), H400–H411. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00048.2021

Dunne, G. D., & Joseph, R. R. (1970). Fertility in hemoglobin S-S and hemoglobin S-C disease. *Fertility and Sterility*, *21*(8), 630–634. https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)37688-9

Eaton, W. A., & Bunn, H. F. (2017). Treating sickle cell disease by targeting HbS polymerization. *Blood*, *129*(20), 2719–2726. https://doi.org/10.1182/blood-2017-02-765891

Eaton, W. A., & Hofrichter, J. (1987). Hemoglobin S Gelation and Sickle Cell Disease. *Blood*, *70*(5), 1245–1266.

Edge, J., Bishop, D. J., & Goodman, C. (2006). Effects of chronic NaHCO3 ingestion during interval training on changes to muscle buffer capacity, metabolism, and short-term endurance performance. *Journal of Applied Physiology*, *101*(3), 918–925. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01534.2005

Egan, B., & Zierath, J. R. (2013). Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metabolism*, *17*(2), 162–184. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.012

Ejindu, V. C., Hine, A. L., Mashayekhi, M., Shorvon, P. J., & Misra, R. R. (2007). Musculoskeletal manifestations of sickle cell disease. *Radiographics*, *27*(4), 1005–1021. https://doi.org/10.1148/rg.274065142

Elbaum, D., & Nagel, R. L. (1981). Esterase activity of hemoglobin. Differences between Hb A and Hb S. *Journal of Biological Chemistry*, *256*(5), 2280–2283. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)69774-7

Elchuri, S. V., Williamson, R. S., Clark Brown, R., Haight, A. E., Spencer, J. B., Buchanan, I., Hassen-Schilling, L., Brown, M. R., Mertens, A. C., & Meacham, L. R. (2015). The effects of hydroxyurea and bone marrow transplant on Anti-Müllerian hormone (AMH) levels in females with sickle cell anemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *55*(1), 56–61. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.03.012

Eliason, G., Abdel-Halim, S. M., Piehl-Aulin, K., & Kadi, F. (2010). Alterations in the muscle-to-capillary interface in patients with different degrees of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research*, *11*, 1–7. https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-97

Ellison, A. M., & Shaw, K. (2007). Management of vasoocclusive pain events in sickle cell disease. *Pediatric Emergency Care*, *23*(11), 832–841. https://doi.org/10.1097/PEC.0b013e31815a05e2

Eltzschig, H. K., & Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion-from mechanism to translation. *Nature Medicine*, *17*(11), 1391–1401. https://doi.org/10.1038/nm.2507

Enns, D. L., & Tiidus, P. M. (2010). The influence of estrogen on skeletal muscle: Sex matters. *Sports Medicine*, *40*(1), 41–58. https://doi.org/10.2165/11319760-000000000-00000

Eriksson, E., & Myrhage, R. (1972). Microvascular Dimensions and Blood Flow in Skeletal Muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, *86*(2), 211–222. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1972.tb05327.x

Eriksson, J. G. (1999). Exercise and the treatment of type 2 diabetes mellitus: An update. *Sports Medicine*, *27*(6), 381–391. https://doi.org/10.2165/00007256-199927060-00003

Fabry, M. E., Sengupta, A., Suzuka, S. M., Costantini, F., Rubin, E. M., Hofrichter, J., Christoph, G., Manci, E., Culberson, D., Factor, S. M., & Nagel, R. L. (1995). A second generation transgenic mouse model expressing both hemoglobin S (HbS) and HbS-antilles results in increased phenotypic severity. *Blood*, *86*(6), 2419–2428. https://doi.org/10.1182/blood.v86.6.2419.bloodjournal8662419

Faes, C., Balayssac-Siransy, E., Connes, P., Hivert, L., Danho, C., Bogui, P., Martin, C., &

Pialoux, V. (2014). Moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia: Effects on oxidative stress and endothelial activation. *British Journal of Haematology*, *164*(1), 124–130. https://doi.org/10.1111/bjh.12594

Faes, C., Charrin, E., Connes, P., Pialoux, V., & Martin, C. (2015). Chronic physical activity limits blood rheology alterations in transgenic SAD mice. *American Journal of Hematology*, *90*(2), E30–E32. https://doi.org/10.1002/ajh.23894

Féasson, L., Stockholm, D., Freyssenet, D., Richard, I., Duguez, S., Beckmann, J. S., & Denis, C. (2002). Molecular adaptations of neuromuscular disease-associated proteins in response to eccentric exercise in human skeletal muscle. *Journal of Physiology*, *543*(1), 297–306. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.018689

Febbraio, M. A., Lambert, D. L., Starkie, R. L., Proietto, J., & Hargreaves, M. (1998). Effect of epinephrine on muscle glycogenolysis during exercise in trained man. *American Physiological*, 465–470. http://www.jap.org

Ferreira, L. F., Townsend, D. K., Lutjemeier, B. J., & Barstow, T. J. (2005). Muscle capillary blood flow kinetics estimated from pulmonary O2 uptake and near-infrared spectroscopy. *Journal of Applied Physiology*, *98*(5), 1820–1828. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00907.2004

Ferster, A., De Valck, C., Azzi, N., Fondu, P., Toppet, M., & Sariban, E. (1992). Bone marrow transplantation in sickle cell anaemia. *Journal of Internal Medicine*, *236*(5), 483–486. https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.1994.tb00833.x

Ferster, A., Tahriri, P., Vermylen, C., Sturbois, G., Corazza, F., Fondu, P., Devalck, C., Dresse, M. F., Feremans, W., Hunninck, K., Toppet, M., Philippet, P., Van Geet, C., & Sariban, E. (2001). Five years of experience with hydroxyurea in children and young adults with sickle cell disease. *Blood*, *97*(11), 3628–3632. https://doi.org/10.1182/blood.V97.11.3628

Files, B., Brambilla, D., Kutlar, A., Miller, S., Vichinsky, E. P., Wang, W. C., Granger, S., & Adams, R. J. (2002). Longitudinal changes in ferritin during chronic transfusion: A report from the stroke prevention trial in sickle cell anemia (STOP). *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, *24*(4), 284–290. https://doi.org/10.1097/00043426-200205000-00013

Frayn, K. N. (1983). Calculation of substrate oxidation rates in vivo from gaseous exchange. *Journal of Applied Physiology*, *121*(6), 628–634.

Frenette, P. S. (2002). Sickle cell vaso-occlusion: Multistep and multicellular paradigm. *Current Opinion in Hematology*, *9*(2), 101–106. https://doi.org/10.1097/00062752-

200203000-00003

Freund, H., Lonsdorfer, J., Oyono-Enguelle, S., Lonsdorfer, A., & Bogui, P. (1992). Lactate exchange and removal abilities in sickle cell patients and in untrained and trained healthy humans. *Journal of Applied Physiology*, *73*(6), 2580–2587. https://doi.org/10.1152/jappl.1992.73.6.2580

Freund, H., Lonsdorfer, J., Oyono-Enguelle, S., Lonsdorfer, A., Dah, C., & Bogui, P. (1995). Lactate exchange and removal abilities in sickle cell trait carriers during and after incremental exercise. *International Journal of Sports Medicine*, *16*(7), 428–434. https://doi.org/10.1055/s-2007-973032

Frey, C., Byrnes, C., & Mazzeo, R. S. (1993). Factors Influencing Excess Postexercise Untrained. *Metabolism*, *42*(7), 822–828.

Gardner, R. V. (2018). Sickle cell disease: Advances in treatment. *Ochsner Journal*, *18*(4), 377–389. https://doi.org/10.31486/toj.18.0076

Gellen, B., Messonnier, L. A., Galactéros, F., Audureau, E., Merlet, A. N., Rupp, T., Peyrot, S., Martin, C., Féasson, L., & Bartolucci, P. (2018). Moderate-intensity endurance-exercise training in patients with sickle-cell disease without severe chronic complications (EXDRE): an open-label randomised controlled trial. *The Lancet Haematology*, *5*(11), e554–e562. https://doi.org/10.1016/S2352-3026(18)30163-7

Ghosh, S., Adisa, O. A., Chappa, P., Tan, F., Jackson, K. A., Archer, D. R., & Ofori-Acquah, S. F. (2013). Extracellular hemin crisis triggers acute chest syndrome in sickle mice. *Journal of Clinical Investigation*, *123*(11), 4809–4820. https://doi.org/10.1172/JCI64578

Gladwin, M. T., & Sachdev, V. (2012). Cardiovascular abnormalities in sickle cell disease. *Journal of the American College of Cardiology*, *59*(13), 1123–1133. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.10.900

Gladwin, M. T., Sachdev, V., Jison, M. L., Shizukuda, Y., Plehn, J. F., Minter, K., Brown, B., Coles, W. A., Nichols, J. S., Ernst, I., Hunter, L. A., Blackwelder, W. C., Schechter, A. N., Rodgers, G. P., Castro, O., & Ognibene, F. P. (2004). Pulmonary Hypertension as a Risk Factor for Death in Patients with Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, *350*(24), 2521–2522. https://doi.org/10.1056/nejm200406103502418

Gladwin, M. T., Schechter, A. N., Ognibene, F. P., Coles, W. A., Reiter, C. D., Schenke, W. H., Csako, G., Waclawiw, M. A., Panza, J. A., & Cannon, R. O. (2003). Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease. *Circulation*, *107*(2), 271–278. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000044943.12533.A8

Gladwin, M. T., Shelhamer, J. H., Ognibene, F. P., Pease-Fye, M. E., Nichols, J. S., Link, B.,

Patel, D. B., Jankowski, M. A., Pannell, L. K., Schechter, A. N., & Rodgers, G. P. (2002). Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, *116*(2), 436–444. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03274.x

Gladwin, M. T., & Vichinsky, E. P. (2009). Pumonary Complications of Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, 2254–2265.

Glenmark, B., Hedberg, G., & Jansson, E. (1992). Changes in muscle fibre type from adolescence to adulthood in women and men. *Acta Physiol Scand*, *146*(2), 251–259.

Gollnick, P. D., & Saltin, B. (1982). Significance of skeletal muscle oxidative enzyme enhancement with endurance training. *Clinical Physiology*, *2*(1), 1–12. https://doi.org/10.1111/j.1475-097X.1982.tb00001.x

Goodpaster, B. H. (2013). Mitochondrial deficiency is associated with insulin resistance. *Diabetes*, *62*(4), 1032–1035. https://doi.org/10.2337/db12-1612

Gouzi, F., Préfaut, C., Abdellaoui, A., Roudier, E., De Rigal, P., Molinari, N., Laoudj-Chenivesse, D., Mercier, J., Birot, O., & Hayot, M. (2013). Blunted muscle angiogenic trainingresponse in COPD patients versus sedentary controls. *European Respiratory Journal*, *41*(4), 806–814. https://doi.org/10.1183/09031936.00053512

Granata, S., Zaza, G., Simone, S., Villani, G., Latorre, D., Pontrelli, P., Carella, M., Schena, F. P., Grandaliano, G., & Pertosa, G. (2009). Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *BMC Genomics*, *10*, 1–13. https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-388

Grau, M., Nader, E., Jerke, M., Schenk, A., Renoux, C., Dietz, T., Collins, B., Bizjak, D. A., Joly, P., Bloch, W., Prokop, A., & Connes, P. (2019). Impact of a six week training program on ventilatory efficiency, red blood cell rheological parameters and red blood cell nitric oxide signaling in young sickle cell anemia patients: A pilot study. *Journal of Clinical Medicine*, *8*(12), 1–16. https://doi.org/10.3390/jcm8122155

Green, J. S., & Crouse, S. F. (1993). Endurance Training, Cardiovascular Function and the Aged. *Sports Medicine: An International Journal of Applied Medicine and Science in Sport and Exercise*, *16*(5), 331–341. https://doi.org/10.2165/00007256-199316050-00004

Greenberg, M. S., & Kass, E. H. (1958). Studies on the Destruction of Red Blood Cells. *A.M.A Archives of Internal Medicine*.

Greenberg, M. S., Kass, E. H., & Castle, W. B. (1957). Studies on the destruction of red blood cells. XII. Factors influencing the role of S hemoglobin in the pathologic physiology of

sickle cell anemia and related disorders. *The Journal of Clinical Investigation*, *36*(6 Part 1), 833–843. https://doi.org/10.1172/jci103489

Greenwood, B. N., Loughridge, A. B., Sadaoui, N., Christianson, J. P., & Fleshner, M. (2013). The protective effects of voluntary exercise against the behavioral consequences of uncontrollable stress persist despite an increase in anxiety following forced cessation of exercise. *Behav Brain Res*, *233*(2), 314–321. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.017.The

Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B. A., Gordon, D. J., Krauss, R. M., Savage, P. J., Smith, S. C., Spertus, J. A., & Costa, F. (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation*, *112*(17), 2735–2752. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.169404

Haas, T. L., & Nwadozi, E. (2015). Regulation of skeletal muscle capillary growth in exercise and disease. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, *40*(12), 1221–1232. https://doi.org/10.1139/apnm-2015-0336

Habara, A. H., Shaikho, E. M., & Steinberg, M. H. (2017). Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: The Arab-Indian haplotype and new therapeutic agents. *American Journal of Hematology*, *92*(11), 1233–1242. https://doi.org/10.1002/ajh.24872

Hackney, A. C., Hezier, W., Gulledge, T. P., Jones, S., Strayhorn, D., Busby, M., Hoffman, E., & Orringer, E. P. (1997). Effects of hydroxyurea administration on the body weight, body composition and exercise performance of patients with sickle-cell anaemia. *Clinical Science*, *92*(5), 481–486. https://doi.org/10.1042/cs0920481

Hagberg, J. M., Hickson, R. C., Ehsani, A. A., & Holloszy, J. O. (1980). Faster adjustment to and recovery from submaximal exercise in the trained state. *Journal of Applied Physiology Respiratory Environmental and Exercise Physiology*, *48*(2), 218–224. https://doi.org/10.1152/jappl.1980.48.2.218

Halestrap, A. P. (2012). *Critical Review The Monocarboxylate Transporter Family — Structure and Functional Characterization*. *64*(January), 1–9. https://doi.org/10.1002/iub.573

Halestrap, A. P. (2013a). Monocarboxylic Acid Transport. *Comprehensive Physiology*, *3*(4), 1611–1643. https://doi.org/10.1002/cphy.c130008

Halestrap, A. P. (2013b). The SLC16 gene family-Structure, role and regulation in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*(2–3), 337–349. https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.003

Halestrap, A. P., & Meredith, D. (2004). The SLC16 gene family — from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Eur J Physiol*, 619–628. https://doi.org/10.1007/s00424-003-1067-2

Halestrap, A. P., & Price, N. T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family : structure, function and regulation. *Biochemical Journal*, *299*, 281–299.

Halestrap, A. P., & Wilson, M. C. (2012). The monocarboxylate transporter family-Role and regulation. *Medical Sciences Building*, *64*(2), 109–119. https://doi.org/10.1002/iub.572

Hashimoto, T., Masuda, S., Taguchi, S., & Brooks, G. A. (2005). Immunohistochemical analysis of MCT1, MCT2 and MCT4 expression in rat plantaris muscle. *Journal of Physiology*, *567*(1), 121–129. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.087411

Hassell, K. L. (2010). Population Estimates of Sickle Cell Disease in the U.S. *American Journal of Preventive Medicine*, *38*(4 SUPPL.), S512–S521. https://doi.org/10.1016/j.amepre.2009.12.022

Hedreville, M., Charlot, K., Waltz, X., Sinnapah, S., Lemonne, N., Etienne-Julan, M., Soter, V., Hue, O., Hardy-Dessources, M. D., Barthélémy, J. C., & Connes, P. (2014). Acute moderate exercise does not further alter the autonomic nervous system activity in patients with sickle cell anemia. *PLoS ONE*, *9*(4), 1–5. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095563

Hepple, R. T., Agey, P. J., Hazelwood, L., Szewczak, J. M., Macmillen, R. E., & Mathieu-Costello, O. (1998). Increased capillarity in leg muscle of finches living at altitude. *Journal of Applied Physiology*, *85*(5), 1871–1876. https://doi.org/10.1152/jappl.1998.85.5.1871

Hepple, R. T., Hogan, M. C., Stary, C., Bebout, D. E., Mathieu-Costello, O., & Wagner, P. D. (2000). Structural basis of muscle O2 diffusing capacity: Evidence from muscle function in situ. *Journal of Applied Physiology*, *88*(2), 560–566. https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.2.560

Hepple, R. T., Mackinnon, S. L. M., Goodman, J. M., Thomas, S. G., & Plyley, M. J. (1997). Resistance and aerobic training in older men: Effects on V̇O(2peak) and the capillary supply to skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, *82*(4), 1305–1310. https://doi.org/10.1152/jappl.1997.82.4.1305

Hermansen, L., & Osnes, J. B. (1972). Blood and muscle pH after maximal exercise in man. *Journal of Applied Physiology*, *32*(3), 304–308. https://doi.org/10.1152/jappl.1972.32.3.304

Herrick, J. B. (1910). Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of

severe anemia. *Archives of Internal Medicine*, *VI*(5), 517–521. https://doi.org/10.1001/archinte.1910.00050330050003

Hibbert, J. M., Hsu, L. L., Bhathena, S. J., Irune, I., Sarfo, B., Creary, M. S., Gee, B. E., Mohamed, A. I., Buchanan, I. D., Al-Mahmoud, A., & Stiles, J. K. (2005). Proinflammatory cytokines and the hypermetabolism of children with sickle cell disease. *Experimental Biology and Medicine*, *230*(1), 68–74. https://doi.org/10.1177/153537020523000109

Hofrichter, J., Ross, P. D., & Eaton, W. A. (1974). Kinetics and mechanism of deoxyhemoglobin S gelation: a new approach to understanding sickle cell disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *71*(12), 4864–4868. https://doi.org/10.1073/pnas.71.12.4864

Holloszy, J. O., Oscai, L. B., Don, I. J., & Molé, P. A. (1970). Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: Adaptive response to exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *40*(6), 1368–1373. https://doi.org/10.1016/0006-291X(70)90017-3

Horwath, O., Apró, W., Moberg, M., Godhe, M., Helge, T., Ekblom, M., Hirschberg, A. L., & Ekblom, B. (2020). Fiber type-specific hypertrophy and increased capillarization in skeletal muscle following testosterone administration in young women. *Journal of Applied Physiology*, *128*(5), 1240–1250. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00893.2019

Horwath, O., Moberg, M., Larsen, F. J., Philp, A., Apró, W., & Ekblom, B. (2021). Influence of sex and fiber type on the satellite cell pool in human skeletal muscle. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, *31*(2), 303–312. https://doi.org/10.1111/SMS.13848

Houmard, J. A., Tanner, C. J., Slentz, C. A., Duscha, B. D., McCartney, J. S., & Kraus, W. E. (2004). Effect of the volume and intensity of exercise training on insulin sensitivity. *Journal of Applied Physiology*, *96*(1), 101–106. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00707.2003

Howard, J., Ataga, K. I., Brown, R. C., Achebe, M. M., Nduba, V., El-Beshlawy, A., Hassab, H., Agodoa, I., Gray, S., Lehrer-Graiwer, J., & Vichinsky, E. P. (2021). Voxelotor in adolescents and adults with sickle cell disease (HOPE): long-term follow-up results of an international, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Haematology*, *8*(5), e323–e333. https://doi.org/10.1016/S2352-3026(21)00059-4

Hui, W. S., Liu, Z., & Ho, S. C. (2010). Metabolic syndrome and all-cause mortality: A meta-

analysis of prospective cohort studies. *European Journal of Epidemiology*, *25*(6), 375–384. https://doi.org/10.1007/s10654-010-9459-z

Hulsizer, J., Resurreccion, W. K., Shi, Z., Billings, L., Caplan, M. S., & Xu, J. (2022). Sickle Cell Trait and Risk for Common Diseases: Evidence from the UK Biobank. *The American Journal of Medicine*.

Hutchaleelaha, A., Patel, M. P., Washington, C., Siu, V., Allen, E., Oksenberg, D., Gretler, D. D., Mant, T., & Lehrer-Graiwer, J. (2019). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of voxelotor (GBT440) in healthy adults and patients with sickle cell disease. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *85*(6), 1290–1302. https://doi.org/10.1111/bcp.13896

Ikuta, T. (2001). Mechanism for fetal globin gene expression: Role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(4), 1847–1852. https://doi.org/10.1073/pnas.041599798

Ingjer, F. (1979). Effects of endurance training on muscle fibre ATP-ase activity, capillary supply and mitochondrial content in man. *The Journal of Physiology*, *294*(1), 419–432. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1979.sp012938

Ingram, V. M. (1959). Abnormal human haemoglobins. III the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobins. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, *36*(2), 402–411. https://doi.org/10.1016/0006-3002(59)90183-0

Issekutz, B., & Miller, H. (1962). Plasma Free Fatty Acids During Exercise and the Effect of Lactic Acid. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *110*(2), 237–239. https://doi.org/10.3181/00379727-110-27478

Jang, T., Mo, G., Stewart, C., Khoury, L., Ferguson, N., Egini, O., Muthu, J., Dutta, D., Salifu, M., & Lim, S. H. (2021). Obesity and diabetes mellitus in patients with sickle cell disease. *Annals of Hematology*, *100*(9), 2203–2205. https://doi.org/10.1007/s00277-021-04578-w

Januel, L., Merlet, A. N., He, Z., Hourdé, C., Bartolucci, P., Gellen, B., Galactéros, F., Messonnier, L. A., & Féasson, L. (2022). Skeletal Muscle Satellite Cells in Sickle Cell Disease Patients and Their Responses to a Moderate-intensity Endurance Exercise Training Program. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *70*(6), 415–426. https://doi.org/10.1369/00221554221103905

Jefferson, J. M., Sims, W. M., Umeh, N., Byeon, Y. J. J., Abdallah, K. E., Bonham, V. L., Naik, R. P., & Smith-Whitley, K. (2021). Splenic infarction in sickle cell trait: A comprehensive systematic review of case studies. *EJHaem*, *2*(3), 585–600. https://doi.org/10.1002/jha2.248

Jeney, V., Balla, J., Yachie, A., Varga, Z., Vercellotti, G. M., Eaton, J. W., & Balla, G. (2002). Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood*, *100*(3), 879–887. https://doi.org/10.1182/blood.V100.3.879

Jeukendrup, A. E., Mensink, M., Saris, W. H. M., & Wagenmakers, A. J. M. (1997). Exogenous glucose oxidation during exercise in endurance-trained and untrained subjects. *Journal of Applied Physiology*, *82*(3), 835–840. https://doi.org/10.1152/jappl.1997.82.3.835

Ji, Y., Chen, S., Xiang, B., Li, Y., Li, L., & Wang, Q. (2016). Jagged1/Notch3 Signaling Modulates Hemangioma-Derived Pericyte Proliferation and Maturation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *40*(5), 895–907. https://doi.org/10.1159/000453148

Jones, M., Ferguson, K., Bailey, S. J., Vanhatalo, A., & Poole, D. C. (2016). Fiber Type-Specific Effects of Dietary Nitrate. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, *44*(2), 53–60. https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000074

Jones, S., D'Silva, A., Bhuva, A., Lloyd, G., Manisty, C., Moon, J. C., Sharma, S., & Hughes, A. D. (2017). Improved exercise-related skeletal muscle oxygen consumption following uptake of endurance training measured using near-infrared spectroscopy. *Frontiers in Physiology*, *8*(DEC), 1–8. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01018

Jones, S. R., Binder, R. A., & Donowho, E. M. (1970). Sudden Death in Sickle-Cell Trait. *N Engl J Med*, *321*(19), 1306–1311.

Jong-Yeon, K., Hickner, R. C., Dohm, G. L., & Houmard, J. A. (2002). Long- and medium-chain fatty acid oxidation is increased in exercise-trained human skeletal muscle. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *51*(4), 460–464. https://doi.org/10.1053/meta.2002.31326

Juel, C. (1998). Skeletal muscle Na+/H+ exchange in rats: pH dependency and the effect of training. *Acta Physiologica Scandinavica*, *164*(2), 135–140. https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.1998.00417.x

Juel, C. (2000). Expression of the Na+/H+ exchanger isoform NHE1 in rat skeletal muscle and effect of training. *Acta Physiologica Scandinavica*, *170*(1), 59–63. https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2000.00759.x

Juel, C. (2006). Training-induced changes in membrane transport proteins of human skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*, *96*(6), 627–635. https://doi.org/10.1007/s00421-006-0140-x

Juel, C. (2008). Regulation of pH in human skeletal muscle: Adaptations to physical activity. *Acta Physiologica*, *193*(1), 17–24. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2008.01840.x

Juel, C., & Halestrap, A. P. (1999). Lactate transport in skeletal muscle - Role and regulation of the monocarboxylate transporter. *Journal of Physiology*, *517*(3), 633–642. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0633s.x

Kadi, F., Schjerling, P., Andersen, L. L., Charifi, N., Madsen, J. L., Christensen, L. R., & Andersen, J. L. (2004). The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *Journal of Physiology*, *558*(3), 1005–1012. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.065904

Kanazashi, M., Okumura, Y., Al-Nassan, S., Murakami, S., Kondo, H., Nagatomo, F., Fujita, N., Ishihara, A., Roy, R. R., & Fujino, H. (2013). Protective effects of astaxanthin on capillary regression in atrophied soleus muscle of rats. *Acta Physiologica*, *207*(2), 405–415. https://doi.org/10.1111/apha.12018

Kang, J., Robertson, R. J., Hagberg J.M., Kelley, D. E., Goss, F. L., DaSilva, S. G., Suminski, R. R., & Utter, A. C. (1996). Effect of Exercise Intensity on Glucose and Insulin Metabolism in Obese Individuals and Obese NIDDM Patients. *Diabetes Care*.

Kano, Shimegi, Takahashi, Masuda, & Katsuta. (2000). Changes in capillary luminal diameter in rat soleus muscle after hind-limb suspension. *Acta Physiologica Scandinavica*, *169*(4), 271–276. https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2000.00743.x

Kark, J. A., Posey, D. M., Schumacher, H. R., & Ruehle, C. J. (1988). Sickle-Cell Trait as a Risk Factor for Sudden Death in Physical Training. *New England Journal of Medicine*, *318*(12), 787–787. https://doi.org/10.1056/nejm198803243181215

Kato, G. J., Hebbel, R. P., Steinberg, M. H., & Gladwin, M. T. (2009). Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *American Journal of Hematology*, *84*(9), 618–625. https://doi.org/10.1002/ajh.21475

Kato, G. J., Steinberg, M. H., & Gladwin, M. T. (2017). Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(3), 750–760. https://doi.org/10.1172/JCI89741

Kaul, D. K., Fabry, M. E., Windisch, P., Baez, S., & Nagel, R. L. (1983). Erythrocytes in sickle cell anemia are heterogeneous in their rheological and hemodynamic characteristics. *Journal of Clinical Investigation*, *72*(1), 22–31. https://doi.org/10.1172/JCI110960

Kaul, D. K., & Hebbel, R. P. (2000). Hypexia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *Journal of Clinical Investigation*, *106*(3), 411–420. https://doi.org/10.1172/JCI9225

Kiens, B., Essen-Gustavsson, B., Christensen, N. J., & Saltin, B. (1993). Skeletal muscle substrate utilization during submaximal exercise in man: effect of endurance training. *The Journal of Physiology*, *469*(1), 459–478. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019823

Kim-Shapiro, D. B., & Gladwin, M. T. (2018). Nitric oxide pathology and therapeutics in sickle cell disease. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, *68*(2–3), 223–237. https://doi.org/10.3233/CH-189009

Kim, J. Y., Hickner, R. C., Cortright, R. L., Dohm, G. L., & Houmard, J. A. (2000). Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *279*(5 42-5), 1039–1044. https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.279.5.e1039

Kjaer, M., Christensen, N. J., Sonne, B., Richter, E. A., & Galbo, H. (1985). Effect of exercise on epinephrine turnover in trained and untrained male subjects. *Journal of Applied Physiology*, *59*(4), 1061–1067. https://doi.org/10.1152/jappl.1985.59.4.1061

Klausen, K., Andersen, L. B., & Pelle, I. (1981). Adaptive changes in work capacity, skeletal muscle capillarization and enzyme levels during training and detraining. *Acta Physiologica Scandinavica*, *113*(1), 9–16. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1981.tb06854.x

Kleiger, R. E., Stein, P. K., & Bigger, J. T. (2005). Heart rate variability: Measurement and clinical utility. *Annals of Noninvasive Electrocardiology*, *10*(1), 88–101. https://doi.org/10.1111/j.1542-474X.2005.10101.x

Klier, M., Schüler, C., Halestrap, A. P., Sly, W. S., Deitmer, J. W., & Becker, H. M. (2011). Transport activity of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 is enhanced by extracellular carbonic anhydrase IV but not by intracellular carbonic anhydrase II. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(31), 27781–27791. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.255331

Kodama, S., Saito, K., Tanaka, S., Maki, M., Yachi, Y., Asumi, M., Sugawara, A., Totsuka, K., Shimano, H., Ohashi, Y., Yamada, N., & Sone, H. (2009). Cardiorespiratory Fitness as a Quantitative Predictor of All-Cause Mortality and Cardiovascular Events. *CLINICIAN'S CORNER*, *301*(19).

Kopeika, J., Oyewo, A., Punnialingam, S., Reddy, N., Khalaf, Y., Howard, J., Mononen, S., & Oteng-Ntim, E. (2019). Ovarian reserve in women with sickle cell disease. *PLoS ONE*, *14*(2), 1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213024

Koppes, G. M., Daly, J. J., Coltman, C. A., & Butkus, D. E. (1977). Exertion-Induced

rhabdomyolysis with acute renal failure and disseminated intravascular coagulation in sickle cell trait. *The American Journal of Medicine*, *63*(2), 313–317. https://doi.org/10.1016/0002-9343(77)90247-9

Koshy, M., Thomas, C., & Goodwin, J. (1990). Vascular lesions in the central nervous system in sickle cell disease (neuropathology). *J Assoc Acad Minor Phys.*, *1*(3).

Kratz, A. L., Ehde, D. M., & Bombardier, C. H. (2014). Affective mediators of a physical activity intervention for depression in multiple sclerosis. *Rehabilitation Psychology*, *59*(1), 57–67. https://doi.org/10.1037/a0035287

Kristensen, J. M., Kristensen, M., & Juel, C. (2004). Expression of Na+/HCO3- co-transporter proteins (NBCs) in rat and human skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, *182*(1), 69–76. https://doi.org/10.1111/j.1365-201X.2004.01297.x

Kusters, Y. H. A. M., & Barrett, E. J. (2016). Muscle microvasculature's structural and functional specializations facilitate muscle metabolism. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *310*(6), E379–E387. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00443.2015

Kutlar, A., Kanter, J., Liles, D. K., Alvarez, O. A., Cançado, R. D., Friedrisch, J. R., Knight-Madden, J. M., Bruederle, A., Shi, M., Zhu, Z., & Ataga, K. I. (2019). Effect of crizanlizumab on pain crises in subgroups of patients with sickle cell disease: A SUSTAIN study analysis. *American Journal of Hematology*, *94*(1), 55–61. https://doi.org/10.1002/ajh.25308

Lamarre, Y., Romana, M., Waltz, X., Lalanne-Mistrish, M. L., Tressières, B., Divialle-Doumdo, L., Hardy-Dessources, M. D., Vent-Schmidt, J., Petras, M., Broquere, C., Maillard, F., Tarer, V., Etienne-Julan, M., & Connes, P. (2012). Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease. *Haematologica*, *97*(11), 1641–1647. https://doi.org/10.3324/haematol.2012.066670

Lamont, C., & Miller, D. J. (1992). Calcium sensitizing action of carnosine and other endogenous imidazoles in chemically skinned striated muscle. *The Journal of Physiology*, *454*(1), 421–434. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019271

Lande, M., Andrews, L., Clark, M. R., Braham, N. V., Black, D. M., Embury, S. H., & Mentzer, W. C. (2017). The Incidence of Painful Crisis in Homozygous Sickle Cell Disease : Correlation With Red Cell Deformability. *Blood*, *72*(6), 2056–2059.

Lanzkron, S., Patrick Carroll, C., & Haywood, C. (2013). Mortality rates and age at death from sickle cell disease: U.S., 1979-2005. *Public Health Reports*, *128*(2), 110–116.

https://doi.org/10.1177/003335491312800206

Laughlin, M. H., & Roseguini, B. (2009). in Skeletal Muscle Blood Flow Capacity : Differences. *J Physiol Pharmacol*, *59*(Suppl 7), 1–16.

Le Gallais, D. (1991). Sickle Cell Trait in Ivory Coast Athletic Champions, 1956—1989. *Combustion Science and Technology*, *25*(5–6), 241–242. https://doi.org/10.1080/00102208108547506

Le Gallais, D., Prefaut, C., Mercier, J., Bile, A., Bogui, P., & Lonsdorfer, J. (1994). Sickle cell trait as a limiting factor for high-level performance in a semi-marathon. *International Journal of Sports Medicine*, *15*(7), 399–402. https://doi.org/10.1055/s-2007-1021077

Le Jeune, S., Lopez-Sublet, M., Dhôte, R., & Mourad, J. J. (2019). Complications vasculaires de la drépanocytose et leur prévention. *JMV-Journal de Médecine Vasculaire*, *44*(2), 128. https://doi.org/10.1016/J.JDMV.2018.12.083

Letvin, N. L., Linch, D. C., Beardsley, G. P., McIntyre, K. W., & Nathan, D. G. (1989). Augmentation of fetal-hemoglobin production in anemic monkeys by hydroxyurea. *N Engl J Med*, *321*(19), 1306–1311.

Li, X., Alvarez, B., Casey, J. R., Reithmeier, R. A. F., & Fliegel, L. (2002). Carbonic Anhydrase II Binds to and Enhances Activity of the Na ⁺ / H ⁺ Exchanger *. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(39), 36085–36091. https://doi.org/10.1074/jbc.M111952200

Li, X., Liu, Y., Alvarez, B. V., Casey, J. R., & Fliegel, L. (2006). A Novel Carbonic Anhydrase II Binding Site Regulates NHE1 Activity †. *Biochemistry*, 2414–2424.

Liebelt, E. L., Balk, S. J., Faber, W., Fisher, J. W., Hughes, C. L., Lanzkron, S. M., Lewis, K. M., Marchetti, F., Mehendale, H. M., Rogers, J. M., Shad, A. T., Skalko, R. G., & Stanek, E. J. (2007). NTP-CERHR Expert Panel Report on the Reproductive and Developmental Toxicity of Hydroxyurea. *Birth Defects Research*, *80*(2), 83–97. https://doi.org/10.1002/bdrb

Lieber, R. L., Brown, C. G., & Trestik, C. L. (1992). Model of muscle-tendon interaction during frog semitendinosis fixed-end contractions. *Journal of Biomechanics*, *25*(4), 421–428. https://doi.org/10.1016/0021-9290(92)90261-X

Liem, R. I., Akinosun, M., Muntz, D. S., & Thompson, A. A. (2017). Feasibility and safety of home exercise training in children with sickle cell anemia. *Pediatric Blood and Cancer*, *64*(12), 1–4. https://doi.org/10.1002/pbc.26671

Liem, R. I., Nevin, M. A., Prestridge, A., Young, L. T., & Thompson, A. A. (2009).

Functional capacity in children and young adults with sickle cell disease undergoing evaluation for cardiopulmonary disease. *American Journal of Hematology*, *84*(10), 645–649. https://doi.org/10.1002/ajh.21507

Liem, R. I., Reddy, M., Pelligra, S. A., Savant, A. P., Fernhall, B., Rodeghier, M., & Thompson, A. A. (2015). Reduced fitness and abnormal cardiopulmonary responses to maximal exercise testing in children and young adults with sickle cell anemia. *Physiological Reports*, *3*(4). https://doi.org/10.14814/phy2.12338

Lillioja, S., Young, A. A., Culter, C. L., Ivy, J. L., Abbott, W. G., Zawadzki, J. K., Yki-Järvinen, H., Christin, L., Secomb, T. W., & Bogardus, C. (1987). Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man. *The Journal of Clinical Investigation*, *80*(2), 415–424. https://doi.org/10.1172/JCI113088

Lind, A. R., & McNicol, G. W. (1967). Circulatory responses to sustained hand-grip contractions performed during other exercise, both rhythmic and static. *J. Physiol*, 595–607.

Lindinger, M. I., Kowalchuk, J. M., & Heigenhauser, G. J. F. (2005). Applying physicochemical principles to skeletal muscle acid-base status. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *289*(3 58-3), 891–894. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00225.2005

Lobov, I. B., Brooks, P. C., & Lang, R. A. (2002). Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(17), 11205–11210. https://doi.org/10.1073/pnas.172161899

Lobov, I. B., Cheung, E., Wudali, R., Cao, J., Halasz, G., Wei, Y., Economides, A., Lin, H. C., Papadopoulos, N., Yancopoulos, G. D., & Wiegand, S. J. (2011). The DII4/notch pathway controls postangiogenic blood vessel remodeling and regression by modulating vasoconstriction and blood flow. *Blood*, *117*(24), 6728–6737. https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-302067

Lohmann, D., Liebold, F., Heilmann, W., Senger, H., & Pohl, A. (1978). Diminished insulin response in highly trained athletes. *Metabolism*, *27*(5), 521–524. https://doi.org/10.1016/0026-0495(78)90017-3

Loiselle, F. B., Morgan, P. E., Alvarez, B. V., & Casey, J. R. (2004). Regulation of the human NBC3 Na+/ HCO- 3 cotransporter by carbonic anhydrase II and PKA. *Am J Physiol Cell Physiol*, *7*.

Lonsdorfer, J., Bogui, P., Le Gallais, D., & Lonsdorfer, A. (1990). Aptitude Des Drépanocytaires à L ’Effort Physique. *Médecine d’Afrique Noire*, *01*(11).

Lopes, F., Traina, F., Almeida, C. B., Leonardo, F. C., Franco-Penteado, C. F., Garrido, V. T., Colella, M. P., Soares, R., Olalla-Saad, S. T., Costa, F. F., & Conran, N. (2015). Key endothelial cell angiogenic mechanisms are stimulated by the circulating milieu in sickle cell disease and attenuated by hydroxyurea. *Haematologica*, *100*(6), 730–739. https://doi.org/10.3324/haematol.2014.119727

Lynch, W. J., Peterson, A. B., Sanchez, V., Abel, J., & Smith, M. A. (2013). Exercise as a novel treatment for drug addiction: A neurobiological and stage-dependent hypothesis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *37*(8), 1622–1644. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.06.011

Maciejewski, H., Bourdin, M., Féasson, L., Dubouchaud, H., Denis, C., Freund, H., & Messonnier, L. A. (2016). Muscle MCT4 content is correlated with the lactate removal ability during recovery following all-out supramaximal exercise in highly-trained rowers. *Frontiers in Physiology*, *7*(JUN), 1–10. https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00223

Magdoff-Fairchild, B., Poillon, W. N., Li, T., & Bertles, J. F. (1976). Thermodynamic studies of polymerization of deoxygenated sickle cell hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *73*(4), 990–994. https://doi.org/10.1073/pnas.73.4.990

Maier-Redelsperger, M., Labie, D., & Elion, J. (1999). Long-term hydroxyurea treatment in young sickle cell patients. *Current Opinion in Hematology*, *6*(2), 115–120. https://doi.org/10.1097/00062752-199903000-00010

Manci, E. A., Hillery, C. A., Bodian, C. A., Zhang, Z. G., Lutty, G. A., & Coller, B. S. (2006). Pathology of Berkeley sickle cell mice: Similarities and differences with human sickle cell disease. *Blood*, *107*(4), 1651–1658. https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2839

Mannion, A. F., Jakeman, P. M., & Willan, P. L. T. (1995). Skeletal muscle buffer value, fibre type distribution and high intensity exercise performance in man. *Experimental Physiology*, *80*(1), 89–101. https://doi.org/10.1113/expphysiol.1995.sp003837

Marahatta, A., & Ware, R. E. (2017). Hydroxyurea: Analytical techniques and quantitative analysis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *67*, 135–142. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.08.009

Marcinek, D. J., Kushmerick, M. J., & Conley, K. E. (2010). Lactic acidosis in vivo: Testing the link between lactate generation and H+ accumulation in ischemic mouse muscle.

Journal of Applied Physiology, *108*(6), 1479–1486. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01189.2009

Martin, C., Pialoux, V., Faes, C., Charrin, E., Skinner, S., & Connes, P. (2018). Does physical activity increase or decrease the risk of sickle cell disease complications? *British Journal of Sports Medicine*, *52*(4), 214–218. https://doi.org/10.1136/bjsports-2015-095317

Masese, R. V., Bulgin, D., Knisely, M. R., Preiss, L., Stevenson, E., Hankins, J. S., Treadwell, M. J., King, A. A., Gordeuk, V. R., Kanter, J., Gibson, R., Glassberg, J. A., Tanabe, P., & Shah, N. (2021). Sex-based differences in the manifestations and complications of sickle cell disease: Report from the sickle cell disease implementation consortium. *PLoS ONE*, *16*(10), 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258638

Matsunaga, T., Weihrauch, D. W., Moniz, M. C., Tessmer, J., Warltier, D. C., & Chilian, W. M. (2002). Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide. *Circulation*, *105*(18), 2185–2191. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000015856.84385.E9

Matte, A., Zorzi, F., Mazzi, F., Federti, E., Olivieri, O., & De Franceschi, L. (2019). New therapeutic options for the treatment of sickle cell disease. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, *11*(1), 1–12. https://doi.org/10.4084/mjhid.2019.002

Mattson, M. P. (2014). Interventions that improve body and brain bioenergetics for parkinson's disease risk reduction and therapy. *Journal of Parkinson's Disease*, *4*(1), 1–13. https://doi.org/10.3233/JPD-130335

Maurel, S., Stojanovic, K. S., Avellino, V., Girshovich, A., Letavernier, E., Grateau, G., Baud, L., Gioret, R., Lionnet, F., & Haymann, J. P. (2014). Prevalence and correlates of metabolic acidosis among patients with homozygous sickle cell disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *9*(4), 648–653. https://doi.org/10.2215/CJN.09790913

McClish, D. K., Smith, W. R., Dahman, B. A., Levenson, J. L., Roberts, J. D., Penberthy, L. T., Aisiku, I. P., Roseff, S. D., & Bovbjerg, V. E. (2009). Pain site frequency and location in sickle cell disease: The PiSCES project. *Pain*, *145*(1–2), 246–251. https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.06.029

McCullagh, K. J. A., Poole, R. C., Halestrap, A. P., O'Brien, M., & Bonen, A. (1996). Role of the lactate transporter (MCT1) in skeletal muscles. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *271*(1 34-1). https://doi.org/10.1152/ajpendo.1996.271.1.e143

McCurdy, P. R., & Sherman, A. S. (1978). Irreversibly sickled cells and red cell survival in sickle cell anemia. A Study with Both DF32P and 51CR. *The American Journal of Medicine*, *64*(2), 253–258. https://doi.org/10.1016/0002-9343(78)90053-0

McGarry, J. D. (1995). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system: Its broadening role in fuel homoeostasis and new insights into its molecular features. *Biochemical Society Transactions*, *23*(2), 321–324. https://doi.org/10.1042/bst0230321

McGinley, C., & Bishop, D. J. (2016). Influence of training intensity on adaptations in acid/base transport proteins, muscle buffer capacity, and repeated-sprint ability in active men. *Journal of Applied Physiology*, *121*(6), 1290–1305. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00630.2016

McKenzie, D. C. (2012). Respiratory physiology: Adaptations to high-level exercise. *British Journal of Sports Medicine*, *46*(6), 381–384. https://doi.org/10.1136/bjsports-2011-090824

McKercher, C., Sanderson, K., Schmidt, M. D., Otahal, P., Patton, G. C., Dwyer, T., & Venn, A. J. (2014). Physical activity patterns and risk of depression in young adulthood: a 20-year cohort study since childhood. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, *49*(11), 1823–1834. https://doi.org/10.1007/s00127-014-0863-7

Merlet, A. N., Chatel, B., Hourdé, C., Ravelojaona, M., Bendahan, D., Féasson, L., & Messonnier, L. A. (2019). How Sickle Cell Disease Impairs Skeletal Muscle Function: Implications in Daily Life. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *51*(1), 4–11. https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001757

Merlet, A. N., Féasson, L., Bartolucci, P., Hourdé, C., Schwalm, C., Gellen, B., Galactéros, F., Deldicque, L., Francaux, M., & Messonnier, L. A. (2020). Muscle structural, energetic and functional benefits of endurance exercise training in sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, *95*(11), 1257–1268. https://doi.org/10.1002/ajh.25936

Merlet, A. N., Messonnier, L. A., Coudy-Gandilhon, C., Béchet, D., Gellen, B., Rupp, T., Galactéros, F., Bartolucci, P., & Féasson, L. (2019). Beneficial effects of endurance exercise training on skeletal muscle microvasculature in sickle cell disease patients. *Blood*, *134*(25), 2233–2241. https://doi.org/10.1182/blood.2019001055

Messonnier, L. A., Bartolucci, P., D'Humieres, T., Dalmais, E., Lacour, J. R., Freund, H., Galactéros, F., & Feasson, L. (2021). Preventive measures for the critical postexercise period in sickle cell trait and disease. *Journal of Applied Physiology*, *130*(2), 485–490. https://doi.org/10.1152/JAPPLPHYSIOL.00855.2020

Messonnier, L. A., Emhoff, C. W., Fattor, J. A., Horning, M. A., Carlson, T. J., & Brooks, G.

A. (2013). Lactate kinetics at the lactate threshold in trained and untrained men. *Journal of Applied Physiology*, *114*(11), 1593–1602. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00043.2013

Messonnier, L. A., Freund, H., Féasson, L., Prieur, F., Castells, J., Denis, C., Linossier, M. T., Geyssant, A., & Lacour, J. R. (2001). Blood lactate exchange and removal abilities after relative high-intensity exercise: Effects of training in normoxia and hypoxia. *European Journal of Applied Physiology*, *84*(5), 403–412. https://doi.org/10.1007/s004210000378

Messonnier, L. A., Gellen, B., Lacroix, R., Peyrot, S., Rupp, T., Mira, J., Peyrard, A., Berkenou, J., Galactéros, F., Bartolucci, P., & Féasson, L. (2019). Physiological Evaluation for Endurance Exercise Prescription in Sickle Cell Disease. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *51*(9), 1795–1801. https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001993

Messonnier, L. A., Kristensen, M., Juel, C., & Denis, C. (2007). Importance of pH regulation and lactate/H+ transport capacity for work production during supramaximal exercise in humans. *Journal of Applied Physiology*, *102*(5), 1936–1944. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00691.2006

Messonnier, L. A., Oyono-Enguéllé, S., Vincent, L., Dubouchaud, H., Chatel, B., Sanchez, H., Malgoyre, A., Martin, C., Galactéros, F., Bartolucci, P., Thiriet, P., & Féasson, L. (2022). Lower Muscle and Blood Lactate Accumulation in Sickle Cell Trait Carriers in Response to Short High-Intensity Exercise. *Nutrients*, *14*(3), 1–14. https://doi.org/10.3390/nu14030501

Metcalf, B., Chuang, C., Dufu, K., Patel, M. P., Silva-Garcia, A., Johnson, C., Lu, Q., Partridge, J. R., Patskovska, L., Patskovsky, Y., Almo, S. C., Jacobson, M. P., Hua, L., Xu, Q., Gwaltney, S. L., Yee, C., Harris, J., Morgan, B. P., James, J., … Li, Z. (2017). Discovery of GBT440, an Orally Bioavailable R-State Stabilizer of Sickle Cell Hemoglobin. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *8*(3), 321–326. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00491

Miller, G. J., Serjeant, G. R., Sivapragasam, S., & Petch, M. C. (1973). Cardio-pulmonary responses and gas exchange during exercise in adults with homozygous sickle-cell disease (sickle-cell anaemia). *Clinical Science*, 113–128.

Millis, R. M., Baker, F. W., Ertugrul, L., Douglas, R. M., & Sexcius, L. (1994). Physical performance decrements in children with sickle cell anemia. *Journal of the National Medical Association*, *86*(2), 113–116.

Moheeb, H., Wali, Y. A., & El-Sayed, M. S. (2007). Physical fitness indices and

anthropometrics profiles in schoolchildren with sickle cell trait/disease. *American Journal of Hematology*, *82*(2), 91–97. https://doi.org/10.1002/ajh.20755

Morici, G., Gruttad'Auria, C. I., Baiamonte, P., Mazzuca, E., Castrogiovanni, A., & Bonsignore, M. R. (2016). Endurance training: Is it bad for you? *Breathe*, *12*(2), 140–147. https://doi.org/10.1183/20734735.007016

Mpalampa, L., Ndugwa, C. M., Ddungu, H., & Idro, R. (2012). Foetal haemoglobin and disease severity in sickle cell anaemia patients in Kampala, Uganda. *BMC Blood Disorders*, *12*(1), 1. https://doi.org/10.1186/1471-2326-12-11

Muller, F. L., Song, W., Liu, Y., Chaudhuri, A., Pieke-Dahl, S., Strong, R., Huang, T. T., Epstein, C. J., Roberts, L. J., Csete, M., Faulkner, J. A., & Van Remmen, H. (2006). Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radical Biology and Medicine*, *40*(11), 1993–2004. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.01.036

Nader, G. A. (2006). Concurrent strength and endurance training: From molecules to man. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *38*(11), 1965–1970. https://doi.org/10.1249/01.mss.0000233795.39282.33

Nahavandi, M., Millis, R. M., Tavakkoli, F., Wyche, M. Q., Perlin, E., Winter, W. P., & Castro, O. (2002). Arterialization of peripheral venous blood in sickle cell disease. *Journal of the National Medical Association*, *94*(5), 320–326.

Nahavandi, M., Tavakkoli, F., Hasan, S. P., Wyche, M. Q., & Castro, O. (2004). Cerebral oximetry in patients with sickle cell disease. *European Journal of Clinical Investigation*, *34*(2), 143–148. https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2004.01307.x

Nahavandi, M., Wyche, M. Q., Perlin, E., Tavakkoli, F., & Castro, O. (2000). Nitric oxide metabolites in sickle cell anemia patients after oral administration of hydroxyurea. *Hematology*, *5*(4), 335–339. https://doi.org/10.1080/10245332.2000.11746528

Naik, R. P., & Haywood, C. (2015). Sickle cell trait diagnosis: Clinical and social implications. *Hematology (United States)*, *2015*(1), 160–167. https://doi.org/10.1182/asheducation-2015.1.160

Nath, K. A., Grande, J. P., Haggard, J. J., Croatt, A. J., Katusic, Z. S., Solovey, A., & Hebbel, R. P. (2001). Oxidative stress and induction of heme oxygenase-1 in the kidney in sickle cell disease. *American Journal of Pathology*, *158*(3), 893–903. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64037-0

Nath, K. A., Katusic, Z. S., & Gladwin, M. T. (2004). The perfusion paradox and vascular instability in sickle cell disease. *Microcirculation*, *11*(2), 179–193.

https://doi.org/10.1080/10739680490278592

Nath, K. A., Shah, V., Haggard, J. J., Croatt, A. J., Smith, L. A., Hebbel, R. P., & Katusic, Z. S. (2000). Mechanisms of vascular instability in a transgenic mouse model of sickle cell disease. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *279*(6 48-6), 1949–1955. https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.6.r1949

Nebor, D., Bowers, A., Hardy-Dessources, M. D., Knight-Madden, J., Romana, M., Reid, H., Barthélémy, J. C., Cumming, V., Hue, O., Elion, J., Reid, M., & Connes, P. (2011). Frequency of pain crises in sickle cell anemia and its relationship with the sympatho-vagal balance, blood viscosity and inflammation. *Haematologica*, *96*(11), 1589–1594. https://doi.org/10.3324/haematol.2011.047365

Neel, J. V. (1949). The Inheritance of Sickle Cell Anemia. *American Association for the Advancement of Science*, *110*(2846), 64–66.

Neeper, S. A., Góauctemez-Pinilla, F., Choi, J., & Cotman, C. (1995). Exercise and brain neurotrophins. In *Nature* (Vol. 373, Issue 6510, p. 109). https://doi.org/10.1038/373109a0

Nelson, D. A., Deuster, P. A., Carter, R., Hill, O. T., Wolcott, V. L., & Kurina, L. M. (2016). Sickle Cell Trait, Rhabdomyolysis, and Mortality among U.S. Army Soldiers. *New England Journal of Medicine*, *375*(5), 435–442. https://doi.org/10.1056/nejmoa1516257

Ngo, S. T., Steyn, F. J., & McCombe, P. A. (2014). Gender differences in autoimmune disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *35*(3), 347–369. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.04.004

Nishijima, T., Llorens-Martín, M., Tejeda, G. S., Inoue, K., Yamamura, Y., Soya, H., Trejo, J. L., & Torres-Alemán, I. (2013). Cessation of voluntary wheel running increases anxiety-like behavior and impairs adult hippocampal neurogenesis in mice. *Behavioural Brain Research*, *245*, 34–41. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.02.009

Noguchi, C. T., Schechter, A. N., & Rodgers, G. P. (1993). 3 Sickle cell disease pathophysiology. In *Bailliere's Clinical Haematology* (Vol. 6, Issue 1). https://doi.org/10.1016/S0950-3536(05)80066-6

Novartis. (2020). *ADAKVEO (crizanlizumab-tmca) for IV infusion: full prescribing information.*

Ogunsile, F. J., Bediako, S. M., Nelson, J., Cichowitz, C., Yu, T., Patrick Carroll, C., Stewart, K., Naik, R. P., Haywood, C., & Lanzkron, S. (2019). Metabolic syndrome among adults living with sickle cell disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *74*(October), 25–29. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2018.10.005

Ohene-Frempong, K., Weiner, S. J., Sleeper, L. A., Miller, S. T., Embury, S., Moohr, J. W., Wethers, D. L., Pegelow, C. H., & Gill, F. M. (1998). Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: Rates and risk factors. *Blood*, *91*(1), 288–294. https://doi.org/10.1182/blood.V91.1.288

Olaniran, K. O., Eneanya, N. D., Nigwekar, S. U., Vela-Parada, X. F., Achebe, M. M., Sharma, A., & Thadhani, R. I. (2019). Sickle Cell Nephropathy in the Pediatric Population. *Blood Purification*, *47*(1–3), 205–213. https://doi.org/10.1159/000494581

Olfert, I. M., Howlett, R. A., Wagner, P. D., & Breen, E. C. (2010). Myocyte vascular endothelial growth factor is required for exercise-induced skeletal muscle angiogenesis. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *299*(4). https://doi.org/10.1152/ajpregu.00347.2010

Osarogiagbon, U. R., Choong, S., Belcher, J. D., Vercellotti, G. M., Paller, M. S., & Hebbel, R. P. (2000). Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. *Blood*, *96*(1), 314–320. https://doi.org/10.1182/blood.v96.1.314.013k39_314_320

Oshida, Y., Yamanouchi, K., Hayamizu, S., & Sato, Y. (1989). Long-term mild jogging increases insulin action despite no influence on body mass index or V̇O2(max). *Journal of Applied Physiology*, *66*(5), 2206–2210. https://doi.org/10.1152/jappl.1989.66.5.2206

Park, S. W., Yun, J. H., Kim, J. H., Kim, K. W., Cho, C. H., & Kim, J. H. (2014). Angiopoietin 2 induces pericyte apoptosis via α3β1 integrin signaling in diabetic retinopathy. *Diabetes*, *63*(9), 3057–3068. https://doi.org/10.2337/db13-1942

Parkhouse, W. S., & McKenzie, D. C. (1984). Possible contribution of skeletal muscle buffers to enhanced anaerobic performance: a brief review. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *16*(4), 328—338. http://europepmc.org/abstract/MED/6092820

Pászty, C., Brion, C. M., Manci, E. A., Witkowska, H. E., Stevens, M. E., Mohandas, N., & Rubin, E. M. (1997). Transgenic knockout mice with exclusively human sickle hemoglobin and sickle cell disease. *Science*, *278*(5339), 876–878. https://doi.org/10.1126/science.278.5339.876

Patel, H. H., Patel, H. R., & Higgins, J. M. (2015). Modulation of red blood cell population dynamics is a fundamental homeostatic response to disease. *American Journal of Hematology*, *90*(5), 422–428. https://doi.org/10.1002/ajh.23982

Patterson, M. F., Stephenson, G. M. M., & Stephenson, D. G. (2006). Denervation produces different single fiber phenotypes in fast- and slow-twitch hindlimb muscles of the rat. In *American Journal of Physiology - Cell Physiology* (Vol. 291, Issue 3). https://doi.org/10.1152/ajpcell.00013.2006

Pauling, L., Itano, H. A., Singer, S. J., & Wells, I. C. (1949). “Sickle cell anemia, a molecular disease.” *Science*, *286*(5444), 1488–1490. https://doi.org/10.1126/science.286.5444.1488

Pegelow, C. H., Colangelo, L., Steinberg, M. H., Wright, E. C., Smith, J., Phillips, G., & Vichinsky, E. P. (1997). Natural history of blood pressure in sickle cell disease: Risks for stroke and death associated with relative hypertension in sickle cell anemia. *American Journal of Medicine*, *102*(2), 171–177. https://doi.org/10.1016/S0002-9343(96)00407-X

Perseghin, G., Price, T. ., Petersen, K. F., Roden, M., Cline, G. W., Gerow, K., Rothman, D. L., & Shulman, G. I. (2013). Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. *The New England Journal of Medicine*, *335*(18), 1357–1362.

Piel, F. B., Hay, S. I., Gupta, S., Weatherall, D. J., & Williams, T. N. (2013). Global Burden of Sickle Cell Anaemia in Children under Five, 2010-2050: Modelling Based on Demographics, Excess Mortality, and Interventions. *PLoS Medicine*, *10*(7). https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001484

Piel, F. B., Patil, A. P., Howes, R. E., Nyangiri, O. A., Gething, P. W., Dewi, M., Temperley, W. H., Williams, T. N., Weatherall, D. J., & Hay, S. I. (2013). Global epidemiology of Sickle haemoglobin in neonates: A contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *The Lancet*, *381*(9861), 142–151. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61229-X

Piel, F. B., Patil, A. P., Howes, R. E., Nyangiri, O. A., Gething, P. W., Williams, T. N., Weatherall, D. J., & Hay, S. I. (2010). Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nature Communications*, *1*(8). https://doi.org/10.1038/ncomms1104

Piel, F. B., Steinberg, M. H., & Rees, D. C. (2017). Sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, *376*(16), 1561–1573. https://doi.org/10.1056/NEJMra1510865

Piel, F. B., Tatem, A. J., Huang, Z., Gupta, S., Williams, T. N., & Weatherall, D. J. (2014). Global migration and the changing distribution of sickle haemoglobin: A quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. *The Lancet Global Health*, *2*(2). https://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70150-5

Pilegaard, H., Domino, K., Noland, T., Juel, C., Hellsten, Y., Halestrap, A. P., & Bangsbo, J. (1999). Effect of high-intensity exercise training on lactate/H+ transport capacity in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *276*(2 39-2). https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.276.2.e255

Platt, O. S., Brambilla, D. J., Rosse, W. F., Milner, P. F., Castro, O., Steinberg, M. H., &

Klug, P. P. (1994). Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *The New England Journal of Medicine*, *330*(23), 1639–1644. https://doi.org/10.1056/NEJM199406093302303

Platt, O. S., Orkin, S. H., & Dover, G. (1984). Hydroxyurea enhanced fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. *Journal of Clinical Investigation*, *74*(2), 652–656. https://doi.org/10.1172/JCI111464

Platt, O. S., Orkin, S. H., Dover, G., Beardsley, G. P., Miller, B., & Nathan, D. G. (1994). Hydroxyurea Enhances Fetal Hemoglobin Production in Sickle Cell Anemia. *J. Clin. Invest.*, *94*(December), 2504–2510.

Platt, O. S., Thorington, B. D., Brambilla, D. J., Milner, P. F., Rosse, W. F., Vichinsky, E. P., & Kinney, T. R. (1991). Pain in sickle cell disease : Rates and Risk Factors. *New England Journal of Medicine*, *325*(5), 303–310.

Ponka, P. (1999). Cell biology of heme. *American Journal of the Medical Sciences*, *318*(4), 241–256. https://doi.org/10.1016/S0002-9629(15)40628-7

Posner, J. D., Gorman, K. M., Klein, H. S., & Woldow, A. (1986). Exercise capacity in the elderly. *The American Journal of Cardiology*, *57*(5). https://doi.org/10.1016/0002-9149(86)91027-1

Potoka, K. P., & Gladwin, M. T. (2015). Vasculopathy and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *308*(4), L314–L324. https://doi.org/10.1152/ajplung.00252.2014

Powars, D., Wilson, B., Imbus, C., Pegelow, C. H., & Allen, J. (1978). The natural history of stroke in sickle cell disease. *The American Journal of Medicine*, *65*(3), 461–471. https://doi.org/10.1016/0002-9343(78)90772-6

Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, *88*(4), 1243–1276. https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2007

Pushkin, A., Abuladze, N., Gross, E., Newman, D., Tatishchev, S., Lee, I., Fedotoff, O., Bondar, G., Azimov, R., Ngyuen, M., & Kurtz, I. (2004). Molecular mechanism of kNBC1 – carbonic anhydrase II interaction in proximal tubule cells. *J Physiol*, *15*(559), 55–65. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.065110

Quinn, C. T., & Ahmad, N. (2005). Clinical correlates of steady-state oxyhaemoglobin desaturation in children who have sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, *131*(1), 129–134. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05738.x

Quinn, C. T., & Sargent, J. W. (2007). *Daytime steady-state haemoglobin desaturation is a*

risk factor for overt stroke in children with scikl cell anaemia.

Ratel, S., & Blazevich, A. J. (2017). Are Prepubertal Children Metabolically Comparable to Well-Trained Adult Endurance Athletes? *Sports Medicine*, *47*(8), 1477–1485. https://doi.org/10.1007/s40279-016-0671-1

Ravelojaona, M. (2015). *Analyse histologique des répercussions musculaires , structurales , énergétiques et microvasculaires chez des hommes et des femmes drépanocytaires*. 206.

Ravelojaona, M., Féasson, L., Oyono-Enguéllé, S., Vincent, L., Djoubairou, B., Ewa'sama Essoue, C., & Messonnier, L. A. (2015). Evidence for a profound remodeling of skeletal muscle and its microvasculature in sickle cell anemia. *American Journal of Pathology*, *185*(5), 1448–1456. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.01.023

Rees, D. C., Williams, T. N., & Gladwin, M. T. (2010). Sickle-cell disease. *The Lancet*, *376*(9757), 2018–2031. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61029-X

Reeson, P., Choi, K., & Brown, C. E. (2018). VEGF signaling regulates the fate of obstructed capillaries in mouse cortex. *ELife*, *7*, 1–26. https://doi.org/10.7554/eLife.33670

Reiter, C. D., Wang, X., Tanus-Santos, J. E., Hogg, N., Cannon, R. O., Schechter, A. N., & Gladwin, M. T. (2002). Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nature Medicine*, *8*(12), 1383–1389. https://doi.org/10.1038/nm799

Rerych, S. K., Scholz, P. M., Sabiston, D. C., & Jones, R. H. (1980). Effects of exercise training on left ventricular function in normal subjects: A longitudinal study by radionuclide angiography. *The American Journal of Cardiology*, *45*(2), 244–252. https://doi.org/10.1016/0002-9149(80)90642-6

Ribeil, J. A., Hacein-Bey-Abina, S., Payen, E., Magnani, A., Semeraro, M., Magrin, E., Caccavelli, L., Neven, B., Bourget, P., El Nemer, W., Bartolucci, P., Weber, L., Puy, H., Meritet, J. F., Grevent, D., Beuzard, Y., Chrétien, S., Lefebvre, T., Ross, R. W., … Cavazzana, M. (2017). Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, *376*(9), 848–855. https://doi.org/10.1056/nejmoa1609677

Richter, E. A., Ruderman, N. B., & Gavras, H. (1982). Muscle glycogenolysis during exercise: Dual control by epinephrine and contractions. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *5*(1). https://doi.org/10.1152/ajpendo.1982.242.1.e25

Robergs, R. A., Ghiasvand, F., & Parker, D. (2005). Lingering construct of lactic acidosis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *289*(3), R904–R910. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00117.2005

Ross, A., & Leveritt, M. (2001). Long-term metabolic and skeletal muscle adaptations to short-sprint training: Implications for sprint training and tapering. *Sports Medicine*,

31(15), 1063–1082. https://doi.org/10.2165/00007256-200131150-00003

Rowe, G. C., Raghuram, S., Jang, C., Nagy, J. A., Patten, I. S., Goyal, A., Chan, M. C., Liu, L. X., Jiang, A., Spokes, K. C., Beeler, D., Dvorak, H., Aird, W. C., & Arany, Z. (2014). PGC-1α induces SPP1 to activate macrophages and orchestrate functional angiogenesis in skeletal muscle. *Circulation Research*, *115*(5), 504–517. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303829

Roy, N. B. A., Fortin, P. M., Bull, K. R., Doree, C., Trivella, M., Hopewell, S., & Estcourt, L. J. (2017). Interventions for chronic kidney disease in people with sickle cell disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2017*(7). https://doi.org/10.1002/14651858.CD012380.pub2

Rstudio, T. (2021). Studio: Integrated Development for R. *PBC, Boston*(MA).

Russell, M. O., Goldberg, H. I., Hodson, A., Kim, H. C., Halus, J., Reivich, M., Schwartz, E., Goldberg, I., & Kim, C. (2021). Effect of transfusion therapy on arteriographic abnormalities and on recurrence of stroke in sickle cell disease. *Blood*, 162–169.

Ryan, N. A., Zwetsloot, K. A., Westerkamp, L. M., Hickner, R. C., Pofahl, W. E., & Gavin, T. P. (2006). Lower skeletal muscle capillarization and VEGF expression in aged vs. young men. *Journal of Applied Physiology*, *100*(1), 178–185. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00827.2005

Ryan, T. M., Ciavatta, D. J., & Townes, T. M. (1997). Knockout-transgenic mouse model of sickle cell disease. *Science*, *278*(5339), 873–876. https://doi.org/10.1126/science.278.5339.873

Sadaf, A., & Quinn, C. T. (2020). L-glutamine for sickle cell disease: Knight or pawn? *Experimental Biology and Medicine*, *245*(2), 146–154. https://doi.org/10.1177/1535370219900637

Sahlin, K., Alvestrand, A., Brandt, R., & Hultman, E. (1978). Acid-base balance in blood during exhaustive bicycle exercise and the following recovery period. *Acta Physiologica Scandinavica*, *104*(3), 370–372. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1978.tb06289.x

Sahlin, K., Harris, R. C., Nylind, B., & Hultman, E. (1976). Lactate content and pH in muscle samples obtained after dynamic exercise. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, *367*(2), 143–149. https://doi.org/10.1007/BF00585150

Saks, V. A., Ventura-Clapier, R., & Aliev, M. K. (1996). Metabolic control and metabolic capacity: Two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1274*(3), 81–88. https://doi.org/10.1016/0005-2728(96)00011-4

Saleh, A. W., Hillen, H. F. P., & Duits, A. J. (1999). Levels of endothelial, neutrophil and platelet-specific factors in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. *Acta Haematologica*, *102*(1), 31–37. https://doi.org/10.1159/000040964

San-Millán, I., & Brooks, G. A. (2018). Assessment of Metabolic Flexibility by Means of Measuring Blood Lactate, Fat, and Carbohydrate Oxidation Responses to Exercise in Professional Endurance Athletes and Less-Fit Individuals. *Sports Medicine*, *48*(2), 467–479. https://doi.org/10.1007/s40279-017-0751-x

Schmidt-Nielsen, K. (1997). *Animal Physiology: Adaptation and Environmen*.

Schoenfeld, T. J., Rada, P., Pieruzzini, P. R., Hsueh, B., & Gould, E. (2013). Physical exercise prevents stress-induced activation of granule neurons and enhances local inhibitory mechanisms in the dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, *33*(18), 7770–7777. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5352-12.2013

Schrauwen, P., Van Aggel-Leijssen, D. P. C., Hul, G., Wagenmakers, A. J. M., Vidal, H., Saris, W. H. M., & Van Baak, M. A. (2002). The effect of a 3-month low-intensity endurance training program on fat oxidation and acetyl-CoA carboxylase-2 expression. *Diabetes*, *51*(7), 2220–2226. https://doi.org/10.2337/diabetes.51.7.2220

Schreiber, G. B., Busch, M. P., Kleinman, S. H., & Korelitz, J. J. (1996). The Risk of Transfusion-Transmitted Viral Infections. *New England Journal of Medicine*, *334*(26), 1685–1690. https://doi.org/10.1056/nejm199606273342601

Schwarze, S. R., Weindruch, R., & Aiken, J. M. (1998). Oxidative stress and aging reduce cox I RNA and cytochrome oxidase activity in Drosophila. *Free Radical Biology and Medicine*, *25*(6), 740–747. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00153-1

Seals, D. R., Hagberg, J. M., Allen, W. K., Hurley, B. F., Dalsky, G. P., Ehsani, A. A., & Holloszy, J. O. (1984). Glucose tolerance in young and older athletes and sedentary men. *Journal of Applied Physiology Respiratory Environmental and Exercise Physiology*, *56*(6), 1521–1525. https://doi.org/10.1152/jappl.1984.56.6.1521

Segal, K. R., Edano, A., Abalos, A., Albu, J., Blando, L., Tomas, M. B., & Pi-Sunyer, F. X. (1991). Effect of exercise training on insulin sensitivity and glucose metabolism in lean, obese, and diabetic men. *Journal of Applied Physiology*, *71*(6), 2402–2411. https://doi.org/10.1152/jappl.1991.71.6.2402

Selma, J., Song, H., Rivera, C., Douglas, S., Akella, A., Bollavaram, K., Thompson, N., Platt, M. O., & Botchwey, E. A. (2022). Sickle cell disease promotes sex-dependent pathological bone loss through enhanced cathepsin proteolytic activity in mice. *Blood Advances*, *6*(5), 1381–1393. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004615

Short, K. R., & Sedlock, D. A. (1997). Excess postexercise oxygen consumption and recovery rate in trained and untrained subjects. *Journal of Applied Physiology*, *83*(1), 153–159. https://doi.org/10.1152/jappl.1997.83.1.153

Sillen, M. J. H., Franssen, F. M. E., Gosker, H. R., Wouters, E. F. M., & Spruit, M. A. (2013). Metabolic and Structural Changes in Lower-Limb Skeletal Muscle Following Neuromuscular Electrical Stimulation: A Systematic Review. *PLoS ONE*, *8*(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069391

Simoneau, J. A., & Bouchard, C. (1989). Human variation in skeletal muscle fiber-type proportion and enzyme activities. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *257*(4), 567–572. https://doi.org/10.1152/ajpendo.1989.257.4.e567

Singh, A., & Xu, Y. J. (2016). The cell killing mechanisms of hydroxyurea. *Genes*, *7*(11). https://doi.org/10.3390/genes7110099

Skinner, S., Ryan, E. D., Stafford, H. C., McMurray, R. G., Key, N. S., & Mooberry, M. J. (2020). An exploratory study of the effects of strenuous exercise on markers of coagulation activation, circulating microparticles, and inflammation in sickle cell trait. *EJHaem*, *1*(1), 251–254. https://doi.org/10.1002/jha2.23

Smith-Whitley, K. (2014). Reproductive issues in sickle cell disease. *Hematology (United States)*, *2014*(1), 418–424. https://doi.org/10.1182/asheducation-2014.1.418

Snyder, R. D. (1984). The role of deoxynucleoside triphosphate pools in the inhibition of DNA-excision repair and replication in human cells by hydroxyurea. *Mutation Research DNA Repair Reports*, *131*(3–4), 163–172. https://doi.org/10.1016/0167-8817(84)90057-9

Soleimani, M., & Burnham, C. E. (2001). Na+:HCO3- cotransporters (NBC): Cloning and characterization. *Journal of Membrane Biology*, *183*(2), 71–84. https://doi.org/10.1007/s00232-001-0055-8

Solovey, A., Kollander, R., Shet, A., Milbauer, L. C., Choong, S., Panoskaltsis-Mortari, A., Blazar, B. R., Kelm, R. J., & Hebbel, R. P. (2004). Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin. *Blood*, *104*(3), 840–846. https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3719

Song, S., Ewald, A. J., Stallcup, W., Werb, Z., & Bergers, G. (2005). PDGFRβ+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nature Cell Biology*, *7*(9), 870–879. https://doi.org/10.1038/ncb1288

Sosa, I. R., & Udden, M. M. (2018). Sickle cell disease and pregnancy. *Critical Care Obstetrics*, 791–801. https://doi.org/10.1002/9781119129400.ch47

Starritt, E. C., Howlett, R. A., Heigenhauser, G. J. F., & Spriet, L. L. (2000). Sensitivity of

CPT I to malonyl-CoA in trained and untrained human skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *278*(3 41-3), 462–468. https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.278.3.e462

Steinberg, M. H., Barton, F., Castro, O., Pegelow, C. H., Ballas, S. K., Kutlar, A., Orringer, E., Bellevue, R., Olivieri, N., Eckman, J., Varma, M., Ramirez, G., Adler, B., Smith, W., Carlos, T., Ataga, K. I., DeCastro, L., Bigelow, C., Saunthararajah, Y., … Terrin, M. (2003). Effect of Hydroxyurea on Mortality and Morbidity in Adult Sickle Cell Anemia: Risks and Benefits Up to 9 Years of Treatment. *Journal of the American Medical Association*, *289*(13), 1645–1651. https://doi.org/10.1001/jama.289.13.1645

Steinberg, M. H., & Embury, S. H. (1986). Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. *The American Society of Hematology*, *71*(1), 1–8.

Steinberg, M. H., Hsu, H., Nagel, R. L., Milner, P. F., Adams, J. G., Benjamin, L., Fryd, S., Gillette, P., Gilman, J., Josifovska, O., Hellman-Erlingsson, S., Safaya, S., Huey, L., & Rieder, R. F. (1995). Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. *American Journal of Hematology*, *48*(3), 175–181. https://doi.org/10.1002/ajh.2830480307

Stettler, N., McKiernan, C. M., Melin, C. Q., Adejoro, O. O., & Walczak, N. B. (2015). Proportion of adults with sickle cell anemia and pain crises receiving hydroxyurea. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *313*(16), 1671–1672. https://doi.org/10.1001/jama.2015.3075

Suetta, C., Aagaard, P., Rosted, A., Jakobsen, A. K., Duus, B., Kjaer, M., & Magnusson, S. P. (2004). Training-induced changes in muscle CSA, muscle strength, EMG, and rate of force development in elderly subjects after long-term unilateral disuse. *Journal of Applied Physiology*, *97*(5), 1954–1961. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01307.2003

Taddesse, A., Woldie, I. L., Khana, P., Swerdlow, P. S., Chu, J. W., Abrams, J., & Abou-Samra, A. B. (2012). Hypogonadism in patients with sickle cell disease: Central or peripheral? *Acta Haematologica*, *128*(2), 65–68. https://doi.org/10.1159/000337344

Tavakkoli, F., Nahavandi, M., Wyche, M. Q., & Castro, O. (2005). Effects of hydroxyurea treatment on cerebral oxygenation in adult patients with sickle cell disease: An open-label pilot study. *Clinical Therapeutics*, *27*(7), 1083–1088. https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2005.07.002

Teichert, M., Milde, L., Holm, A., Stanicek, L., Gengenbacher, N., Savant, S., Ruckdeschel, T., Hasanov, Z., Srivastava, K., Hu, J., Hertel, S., Bartol, A., Schlereth, K., & Augustin,

H. G. (2017). Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation. *Nature Communications*, *8*, 16106. https://doi.org/10.1038/ncomms16106

Ter Maaten, J. C., Serné, E. H., Bakker, S. J. L., Van Eps, W. S., Donker, A. J. M., & Gans, R. O. B. (2001). Effects of insulin on glucose uptake and leg blood flow in patients with sickle cell disease and normal subjects. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *50*(4), 387–392. https://doi.org/10.1053/meta.2001.21681

Thomas, C., Bishop, D. J., Moore-Morris, T., & Mercier, J. (2007). Effects of high-intensity training on MCT1, MCT4, and NBC expressions in rat skeletal muscles: Influence of chronic metabolic alkalosis. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *293*(4), 916–922. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00164.2007

Thornburg, C. D., Dixon, N., Burgett, S., Mortier, N. A., Schultz, W. H., Zimmerman, S. A., Bonner, M., Hardy, K. K., Calatroni, A., & Ware, R. E. (2009). A Pilot Study of Hydroxyurea to Prevent Chronic Organ Damage in Young Children With Sickle Cell Anemia. *Pediatric Blood & Cancer*, *February*, 1388–1389. https://doi.org/10.1002/pbc

Tian, Q., Erickson, K. I., Simonsick, E. M., Aizenstein, H. J., Glynn, N. W., Boudreau, R. M., Newman, A. B., Kritchevsky, S. B., Yaffe, K., Harris, T. B., & Rosano, C. (2014). Physical activity predicts microstructural integrity in memory-related networks in very old adults. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, *69*(10), 1284–1290. https://doi.org/10.1093/gerona/glt287

Tripette, J., Connes, P., Beltan, É., Chalabi, T., Marlin, L., Chout, R., Baskurt, O. K., Hue, O., & Hardy-Dessources, M. D. (2010). 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. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, *45*(1), 39–52. https://doi.org/10.3233/CH-2010-1325

Trudel, M., De Paepe, M., Chrétien, N., Saadane, N., Jacmain, J., Sorette, M., Hoang, T., & Beuzard, Y. (1994). Sickle cell disease of transgenic SAD mice. *Blood*, *84*(9), 3189–3197. https://doi.org/10.1182/blood.v84.9.3189.3189

Trudel, M., Saadane, N., Garel, M. C., Bardakdjian-Michau, J., Blouquit Guerquin-Kern, Y. J. L., Rouyer-Fessard, P., Vidaud, D., Pachnis, A., Romeo, P. H., Beuzard, Y., & Costantini, F. (1991). Towards a transgenic mouse model of sickle cell disease: Hemoglobin SAD. *EMBO Journal*, *10*(11), 3157–3165. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04877.x

Uchida, C., Nwadozi, E., Hasanee, A., Olenich, S., Olfert, I. M., & Haas, T. L. (2015). Muscle-derived vascular endothelial growth factor regulates microvascular remodelling

in response to increased shear stress in mice. *Acta Physiologica*, *214*(3), 349–360. https://doi.org/10.1111/apha.12463

Ueda, Y., & Bookchin, R. M. (1984). Effects of carbon dioxide and pH variations in vitro on blood respiratory functions, red blood cell volume, transmembrane pH gradients, and sickling in sickle cell anemia. *J Lab Clin Med.*

Ueda, Y., Nagel, R. L., & Bookchin, R. M. (1979). An Increased Bohr Effect in Sickle Cell Anemia. *Blood*, *22*(23), 3393–3396.

Ullah, M. S., Davies, A. J., & Halestrap, A. P. (2006). The Plasma Membrane Lactate Transporter MCT4 , but Not MCT1 , Is Up-regulated by Hypoxia through a HIF-1 alpha -dependent Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(14), 9030–9037. https://doi.org/10.1074/jbc.M511397200

Valeriano-Marcet, J., & Kerr, L. D. (1991). Myonecrosis and myofibrosis as complications of sickle cell anemia. *Annals of Internal Medicine*, *115*(2), 99–101. https://doi.org/10.7326/0003-4819-115-2-99

Vekilov, P. G. (2007). Sickle-cell haemoglobin polymerization: Is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? *British Journal of Haematology*, *139*(2), 173–184. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06794.x

Velusamy, P., Mohan, T., Ravi, D. B., Kishore Kumar, S. N., Srinivasan, A., Chakrapani, L. N., Singh, A., Varadharaj, S., & Kalaiselvi, P. (2020). Targeting the Nrf2/ARE Signalling Pathway to Mitigate Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy: Plausible Role of Hesperetin in Redox Homeostasis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2020*. https://doi.org/10.1155/2020/9568278

Venables, M. C., & Jeukendrup, A. E. (2008). Endurance training and obesity: Effect on substrate metabolism and insulin sensitivity. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *40*(3), 495–502. https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31815f256f

Vermylen, C., Ninane, J., Fernandez Robles, E., & Cornu, G. (1988). Bone Marrow Transplantation in Five Children With Sickle Cell Anaemia. *The Lancet*, *331*(8600), 1427–1428. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)92239-8

Vichinsky, E. P., Hoppe, C. C., Ataga, K. I., Ware, R. E., Nduba, V., El-Beshlawy, A., Hassab, H., Achebe, M. M., Alkindi, S., Brown, R. C., Diuguid, D. L., Telfer, P., Tsitsikas, D. A., Elghandour, A., Gordeuk, V. R., Kanter, J., Abboud, M. R., Lehrer-Graiwer, J., Tonda, M., … Howard, J. (2019). A Phase 3 Randomized Trial of Voxelotor in Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, *381*(6), 509–519. https://doi.org/10.1056/nejmoa1903212

Vichinsky, E. P., Neumayr, L. D., Earles, A. N., Williams, R., Lennette, E. T., Dean, D., Nickerson, B., Orringer, E., McKie, V., Bellevue, R., Daeschner, C., & Manci, E. A. (2000). Causes and Outcomes of the Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, 1855–1865.

Vincent, L., Féasson, L., Oyono-Enguéllé, S., Banimbek, V., Denis, C., Guarneri, C., Aufradet, E., Montchanin, G., Martin, C., Gozal, D., Dohbobga, M., Wouassi, D., Garet, M., Thiriet, P., & Messonnier, L. A. (2010). Remodeling of skeletal muscle microvasculature in sickle cell trait and α-thalassemia. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *298*(2). https://doi.org/10.1152/ajpheart.00812.2009

Vincent, L., Féasson, L., Oyono-Enguéllé, S., Banimbek, V., Monchanin, G., Dohbobga, M., Wouassi, D., Martin, C., Gozal, D., Geyssant, A., Thiriet, P., Denis, C., & Messonnier, L. A. (2010). Skeletal muscle structural and energetic characteristics in subjects with sickle cell trait, α-thalassemia, or dual hemoglobinopathy. *Journal of Applied Physiology*, *109*(3), 728–734. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00349.2010

Vincent, L., Oyono-Enguéllé, S., Féasson, L., Banimbek, V., Dohbobga, M., Martin, C., Thiriet, P., Francina, A., Dubouchaud, H., Sanchez, H., Chapot, R., Denis, C., Geyssant, A., & Messonnier, L. A. (2012). Effects of regular physical activity on skeletal muscle structural, energetic, and microvascular properties in carriers of sickle cell trait. *Journal of Applied Physiology*, *113*(4), 549–556. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01573.2011

Virkki, L. V., Wilson, D. A., Vaughan-Jones, R. D., & Boron, W. F. (2002). Functional characterization of human NBC4 as an electrogenic Na+-HCO3- cotransporter (NBCe2). *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *282*(6 51-6), 1278–1289. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00589.2001

Voskaridou, E., Christoulas, D., Bilalis, A., Plata, E., Varvagiannis, K., Stamatopoulos, G., Sinopoulou, K., Balassopoulou, A., Loukopoulos, D., & Terpos, E. (2010). The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle cell syndromes: Results of a 17-year, single-center trial (LaSHS). *Blood*, *115*(12), 2354–2363. https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-221333

Wali, Y. A., & Moheeb, H. (2011). Effect of hydroxyurea on physical fitness indices in children with sickle cell anemia. *Pediatric Hematology and Oncology*, *28*(1), 43–50. https://doi.org/10.3109/08880018.2010.524278

Walker, D. K., Fry, C. S., Drummond, M. J., Dickinson, J. M., Timmerman, K. L., Gundermann, D. M., Jennings, K., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2012). PAX7+

satellite cells in young and older adults following resistance exercise. *Muscle and Nerve*, *46*(1), 51–59. https://doi.org/10.1002/mus.23266

Wallace, K. L., Marshall, M. A., Ramos, S. I., Lannigan, J. A., Field, J. J., Strieter, R. M., & Linden, J. (2009). NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN-γ and CXCR3 chemokines. *Blood*, *114*(3), 667–676. https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-205492

Waltz, X., Hedreville, M., Sinnapah, S., Lamarre, Y., Soter, V., Lemonne, N., Etienne-Julan, M., Beltan, E., Chalabi, T., Chout, R., Hue, O., Mougenel, D., Hardy-Dessources, M. D., & Connes, P. (2012). Delayed beneficial effect of acute exercise on red blood cell aggregate strength in patients with sickle cell anemia. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, *52*(1), 15–26. https://doi.org/10.3233/CH-2012-1540

Waltz, X., Pichon, A., Lemonne, N., Mougenel, D., Lalanne-Mistrih, M. L., Lamarre, Y., Tarer, V., Tressières, B., Etienne-Julan, M., Hardy-Dessources, M. D., Hue, O., & Connes, P. (2012). Normal Muscle Oxygen Consumption and Fatigability in Sickle Cell Patients Despite Reduced Microvascular Oxygenation and Hemorheological Abnormalities. *PLoS ONE*, *7*(12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052471

Wang, W. C., Helms, R. W., Lynn, H. S., Redding-Lallinger, R., Gee, B. E., Ohene-Frempong, K., Smith-Whitley, K., Waclawiw, M. A., Vichinsky, E. P., Styles, L. A., Ware, R. E., & Kinney, T. R. (2002). Effect of hydroxyurea on growth in children with sickle cell anemia: Results of the HUG-KIDS study. *Journal of Pediatrics*, *140*(2), 225–229. https://doi.org/10.1067/mpd.2002.121383

Wang, W. C., Ware, R. E., Miller, S. T., Iyer, R. V., Casella, J. F., Minniti, C. P., Rana, S., Thornburg, C. D., Rogers, Z. R., Kalpatthi, R. V., Barredo, J. C., Brown, R. C., Sarnaik, S. A., Howard, T. H., Wynn, L. W., Kutlar, A., Armstrong, F. D., Files, B. A., Goldsmith, J. C., … Thompson, B. W. (2011). Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: A multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). *The Lancet*, *377*(9778), 1663–1672. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60355-3

Ware, R. E. (2010). How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. *Blood*, *115*(26), 5300–5311. https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-146852

Ware, R. E., de Montalembert, M., Tshilolo, L., & Abboud, M. R. (2017). Sickle cell disease. *The Lancet*, *390*(10091), 311–323. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30193-9

Ware, R. E., Zimmerman, S. A., Sylvestre, P. B., Mortier, N. A., Davis, J. S., Treem, W. R., & Schultz, W. H. (2004). Prevention of secondary stroke and resolution of transfusional

iron overload in children with sickle cell anemia using hydroxyurea and phlebotomy. *Journal of Pediatrics*, *145*(3), 346–352. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2004.04.058

Watt, M. J., Howlett, K. F., Febbraio, M. A., Spriet, L. L., & Hargreaves, M. (2001). Adrenaline increases skeletal muscle glycogenolysis, pyruvate dehydrogenase activation and carbohydrate oxidation during moderate exercise in humans. *Journal of Physiology*, *534*(1), 269–278. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00269.x

Wilmore, J. H., Costill, D. L., & Gleim, G. W. (2008). Physiology of Sport and Exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, *27*(5), 792. https://doi.org/10.1249/00005768-199505000-00024

Winder, W. W., Hagberg, J. M., Hickson, R. C., Ehsani, A. A., & McLane, J. A. (1978). Time course of sympathoadrenal adaptation to endurance exercise training in man. *Journal of Applied Physiology Respiratory Environmental and Exercise Physiology*, *45*(3), 370–374. https://doi.org/10.1152/jappl.1978.45.3.370

Winder, W. W., Hickson, R. C., Hagberg, J. M., Ehsani, A. A., & McLane, J. A. (1979). Training-induced changes in hormonal and metabolic responses to submaximal exercise. *Journal of Applied Physiology Respiratory Environmental and Exercise Physiology*, *46*(4), 766–771. https://doi.org/10.1152/jappl.1979.46.4.766

Wirthwein, D. P., Spotswood, S. D., Barnard, J. J., & Prahlow, J. A. (2001). Death Due to Microvascular Occlusion in Sickle-Cell Trait Following Physical Exertion. *Journal of Forensic Sciences*, *46*(2), 14982J. https://doi.org/10.1520/jfs14982j

Wong, T. E., Brandow, A. M., Lim, W., & Lottenberg, R. (2014). Update on the use of hydroxyurea therapy in sickle cell disease. *Blood*, *124*(26), 3850–3857. https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-435768

Wood, K. C., Hebbel, R. P., & Granger, D. N. (2005). Endothelial cell NADPH oxidase mediates the cerebral microvascular dysfunction in sickle cell transgenic mice. *The FASEB Journal*, *19*(8), 989–991. https://doi.org/10.1096/fj.04-3218fje

Wood, K. C., Hsu, L. L., & Gladwin, M. T. (2008). Sickle cell disease vasculopathy: A state of nitric oxide resistance. *Free Radical Biology and Medicine*, *44*(8), 1506–1528. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.008

Wu, L. C., Sun, C. W., Ryan, T. M., Pawlik, K. M., Ren, J., & Townes, T. M. (2006). Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells. *Blood*, *108*(4), 1183–1188. https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-004812

Yavropoulou, M. P., Pikilidou, M., Pantelidou, D., Tsalikakis, D. G., Mousiolis, A., Chalkia, P., Yovos, J. G., & Zebekakis, P. (2017). Insulin Secretion and Resistance in

Normoglycemic Patients with Sickle Cell Disease. *Hemoglobin*, *41*(1), 6–11. https://doi.org/10.1080/03630269.2017.1295983

Yawn, B. P., Buchanan, G. R., Afenyi-Annan, A. N., Ballas, S. K., Hassell, K. L., James, A. H., Jordan, L., Lanzkron, S. M., Lottenberg, R., Savage, W. J., Tanabe, P. J., Ware, R. E., Murad, M. H., Goldsmith, J. C., Ortiz, E., Fulwood, R., Horton, A., & John-Sowah, J. (2014). Management of sickle cell disease: Summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *312*(10), 1033–1048. https://doi.org/10.1001/jama.2014.10517

Zanoni, C. T., Galvão, F., Cliquet Junior, A., & Saad, S. T. O. (2015). Pilot randomized controlled trial to evaluate the effect of aquatic and land physical therapy on musculoskeletal dysfunction of sickle cell disease patients. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, *37*(2), 82–89. https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2014.11.010

Zarins, Z. A., Wallis, G. A., Faghihnia, N., Johnson, M. L., Fattor, J. A., Horning, M. A., & Brooks, G. A. (2009). Effects of endurance training on cardiorespiratory fitness and substrate partitioning in postmenopausal women. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *58*(9), 1338–1346. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.04.018

Zemel, B. S., Kawchak, D. A., Ohene-Frempong, K. O., Schall, J. I., & Stallings, V. A. (2007). Effects of Delayed Pubertal Development, Nutritional Status, and Disease Severity on Longitudinal Patterns of Growth Failure in Children With Sickle Cell Disease. *Pediatric Research*, *61*(5), 607–613. https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e318045bdca

Zennadi, R., Hines, P. C., De Castro, L. M., Cartron, J. P., Parise, L. V., & Telen, M. J. (2004). Epinephrine acts through erythroid signaling pathways to activate sickle cell adhesion to endothelium via LW-αvβ3 interactions. *Blood*, *104*(12), 3774–3781. https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0042

Zennadi, R., Moeller, B. J., Whalen, E. J., Batchvarova, M., Xu, K., Shan, S., Delahunty, M., Dewhirst, M. W., & Telen, M. J. (2007). Epinephrine-induced activation of LW-mediated sickle cell adhesion and vaso-occlusion in vivo. *Blood*, *110*(7), 2708–2717. https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-056101

Zhou, L. Z. H., Johnson, A. P., & Rando, T. A. (2001). NFκB and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*, *31*(11), 1405–1416. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00719-5

Ziche, M., Morbidelli, L., Choudhuri, R., Zhang, H. T., Donnini, S., Granger, H. J., &

Bicknell, R. (1997). Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, *99*(11), 2625–2634. https://doi.org/10.1172/jci119451

Zlebnik, N. E., Anker, J. J., & Carroll, M. E. (2012). Exercise to reduce the escalation of cocaine self-administration in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology*, *224*(3), 387–400. https://doi.org/10.1007/s00213-012-2760-7

ANNEXES

Publications et communications

Publications de revues scientifiques

Riccetti, M.; Opplert, J.; Durigan, J.L.Q.; Cometti, C.; Babault, N. Acute Static Stretching Results in Muscle-Specific Alterations amongst the Hamstring Muscles. **Sports** 2020, 8, 119. https://doi.org/10.3390/sports8090119

Messonnier, L.A.; **Riccetti, M**.; Chatel, B.; Galactéros, F.; Gellen, B.; Rupp T.; Féasson, L.; Bartolucci, P. How to implement endurance exercise training in sickle cell disease. **Haematologica**. 2021;106(5):1476-1479. Published 2021 May 1. Présenté page 265.
https://doi:10.3324/haematol.2020.267047

Riccetti, M.; Mougin, L.; Merlet, A.N.; Bartolucci, P.; Gellen, B.; Rupp T.; Blervaque, L.; d'Humières, T.; Galactéros, F.; Emhoff, C.W.; Féasson, L.; Messonnier, L.A. Endurance training improves O_2 uptake/demand mismatch, metabolic flexibility and recovery in sickle cell disease patients. (Soumis à ***Medicine & Science in Sports & Exercise, MSSE***).

Riccetti, M.; Blervaque, L.; Ravelojaona, M.; Delabre, J.; Chatel, B.; Hourdé, C.; Bexon, C.; Martin, C.; Oyono-Enguellé, S; Féasson, L.; Messonnier, L.A. Microvascular and tissular remodeling observed in sickle cell trait and disease include gender and genotype specificities: insights from skeletal muscle. (Soumis prochainement à ***Blood***).

Riccetti, M.; Michel, C.; Féasson, L.; Messonnier, L.A. Effects of hydroxyurea (HU) on skeletal muscle microvasculature and structural of mice with SCD. (En cours d'écriture).

Riccetti, M.; Rojo, M.; Ravelojaona, M.; Chatel, B.; Féasson, L.; Messonnier, L.A. Comparative physiology study between humans and mice (Townes model) CON, SCT and SCD. (En cours d'écriture).

Vulgarisation scientifique

Riccetti, M. (2022). « Répercussions de la drépanocytose, des traitements médicamenteux et de l'entraînement en endurance sur le tissu musculaire (son phénotype, son métabolisme et sa fonction) et la qualité de vie des patients ». **Ma thèse en 180 secondes,** Octobre, Fête de la Sciences, Annecy, France.

Riccetti, M. (2022). « Répercussions de la drépanocytose, des traitements médicamenteux et de l'entraînement en endurance sur le tissu musculaire (son phénotype, son métabolisme et sa fonction) et la qualité de vie des patients ». **Ma thèse en 180 secondes,** sélection à l'Université Savoie Mont Blanc, Chambéry, France.

Congrès Internationaux

Riccetti, M.; Chatel, B.; Féasson, L.; Delabre, J.; Messonnier, L.A. (2021). Mechanisms of muscle pH regulation in sickle cell disease. Congrès International de l'Association des Chercheurs en Activité Physique et Sportive (ACAPS). Octobre, Montpellier, France (présentation orale).

Riccetti, M.; Mechanisms of muscle pH regulation in sickle cell disease (2021). Virtual ECSS. En ligne (présentation vidéo).

Riccetti, M.; Michel, C.; Merlet, A.; Féasson, L.; Bendahan, D.; Messonnier, L.A (2022). Effects of Hydroxyurea on skeletal muscle microvasculature of mice with Sickle Cell Disease. 4th Global Congress on Sickle Cell Disease. Juin, Paris, France (Poster présenté par Messonier, L.A).

Fiches méthodologiques

PROTOCOLE D'EXTRACTION POUR DOSAGE ENZYMATIQUE
SPECTROPHOTOMETRIE : ENOLASE
SPECTROPHOTOMETRIE : LACTATE DESHYDROGENASE
SPECTROPHOTOMETRIE : CITRATE SYNTHASE
SPECTROPHOTOMETRIE : MYOKINASE
SPECTROPHOTOMETRIE : CREATINE KINASE
PROTOCOLE D'EXTRACTION POUR WESTERN BLOT
WESTERN BLOT

Messonnier, L.A.; ***Riccetti, M.****; Chatel, B.; Galactéros, F.; Gellen, B.; Rupp T.; Féasson, L.; Bartolucci, P. How to implement endurance exercise training in sickle cell disease.* ***Haematologica****. 2021;106(5):1476-1479. Published 2021 May 1.*
https://doi:10.3324/haematol.2020.267047

Published Ahead of Print on August 27, 2020, as doi:10.3324/haematol.2020.267047.
Copyright 2020 Ferrata Storti Foundation.

haematologica
Journal of The Ferrata Storti Foundation

How to implement endurance exercise training in sickle cell disease

by Laurent A. Messonnier , Manon Riccetti, Benjamin Chatel, Frédéric Galactéros, Barnabas Gellen, Thomas Rupp, Léonard Féasson, and Pablo Bartolucci

Haematologica 2020 [Epub ahead of print]

Citation: Laurent A. Messonnier , Manon Riccetti, Benjamin Chatel, Frédéric Galactéros, Barnabas Gellen, Thomas Rupp, Léonard Féasson, and Pablo Bartolucci. How to implement endurance exercise training in sickle cell disease.
Haematologica. 2020; 105:xxx
doi:10.3324/haematol.2020.267047

Publisher's Disclaimer.
E-publishing ahead of print is increasingly important for the rapid dissemination of science. Haematologica is, therefore, E-publishing PDF files of an early version of manuscripts that have completed a regular peer review and have been accepted for publication. E-publishing of this PDF file has been approved by the authors. After having E-published Ahead of Print, manuscripts will then undergo technical and English editing, typesetting, proof correction and be presented for the authors' final approval; the final version of the manuscript will then appear in print on a regular issue of the journal. All legal disclaimers that apply to the journal also pertain to this production process.

LETTER TO THE EDITOR

How to implement endurance exercise training in sickle cell disease.

Laurent A. Messonnier[1], Manon Riccetti[1], Benjamin Chatel[2], Frédéric Galactéros[3,4], Barnabas Gellen[5], Thomas Rupp[1], Léonard Féasson[6,7] and Pablo Bartolucci[3,4]

[1] Université Savoie Mont Blanc, Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité, EA7424, Chambéry, France.

[2] CellMade, Le Bourget-du-Lac, France

[3] Sickle Cell Referral Center, UMGGR, Hôpital Henri-Mondor (AP-HP), Université Paris-Est Créteil (UPEC), Créteil, France.

[4] Institut Mondor de Recherche Biomédicale, unité 2, Inserm, Hôpital Universitaire Henri-Mondor, Université Paris-Est Créteil (UPEC), Créteil, France.

[5] Department of Cardiac Rehabilitation, Henri-Mondor University Hospital, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (AP-HP), Créteil, France.

[6] Université de Lyon, Université Jean Monnet, Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité, EA 7424, Saint-Etienne, France.

[7] Unité de Myologie, Service de Physiologie Clinique et de l'Exercice, Hôpital Universitaire de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France.

Corresponding Author:

Laurent A. Messonnier, Ph.D

Université Savoie Mont Blanc, Laboratoire LIBM

Campus Universitaire Savoie Technolac

F-73376 Le Bourget du Lac Cedex, France

Phone: 33 (0) 4 79 75 81 85

e-mail: laurent.messonnier@univ-smb.fr

Running title: Implementation of endurance exercise in SCD

Keywords: Physical activity, lactate, heart rate, exercise intensity

A previous study demonstrated the safety and the beneficial effects of moderate-intensity endurance exercise training in sickle cell disease (SCD) patients. However, this previous pilot study revealed several limitations. The most important constraint was the need for repeated blood lactate concentration measurements to adjust training intensity. This approach considerably hinders implementation and dissemination of endurance exercise training in the general population of SCD patients. In the present study, we tested heart rate as a possible surrogate for adjustment of training intensity. Patients (n = 15) performed successively an initial submaximal incremental test (SIT1), 30-min moderate-intensity cycling exercises 3 times a week for 8 weeks, and finally another SIT (SIT2). Heart rate (HR) and blood lactate concentration ($[lactate]_b$) were recorded every minute during SITs and once during training sessions. $[lactate]_b$ and HR values measured during training concurred with the correlation obtained between $[lactate]_b$ and HR during SITs. Provided that patients' individual $[lactate]_b$ vs. HR relationship (obtained during a SIT) is known and patients are accustomed to cycling exercise, HR appears to be an acceptable surrogate to control and adjust intensity of endurance exercises.

Sickle cell disease (SCD) is the most frequent genetic disease worldwide. Vaso-occlusion and anemia, the two main consequences of the disease, induce a myriad of complications affecting almost all organs. Physical exercise was until recently considered a risk for SCD patients. Indeed, 31% of vaso-occlusive crises (VOC) and 32% of secondary acute chest syndromes occur subsequent to exertion.[1] However, recent reports provided evidence that when well-calibrated, moderate-intensity endurance-exercise training in adults with sickle-cell disease without severe chronic complications seems safe, significantly improved functional capacity and is a potential novel therapeutic strategy.[2,3] Although encouraging, this previous pilot study suffers from several constraints, limiting its scientific and clinical impact: the training program was

relatively short, involved a limited number of patients, was performed on cycle-ergometers in a medical center under the supervision of a physician, and required repeated blood lactate concentration ($[lactate]_b$) measurements.[2,3] These limitations hinder implementation and dissemination of long-term endurance exercise training in the general population of SCD patients. The key point was therefore to find non-invasive marker to adjust exercise intensity during endurance training and physical activity in SCD patients. Here we proposed and tested heart rate as the possible surrogate.

Data from 8 men (53%) and 7 women (47%) adult SCD patients (34±11 years, 172±10 cm, 66±11 kg) was analyzed (ClinicalTrials.gov, number NCT02571088). Patients successively underwent a submaximal incremental test (SIT1), an 8-week endurance exercise training program, and a post-training SIT (SIT2). SIT1 and SIT2 started at 20 or 30 W and increased every two minutes by 10 or 15 W for females and males, respectively. Heart rate (HR) and blood lactate concentration ($[lactate]_b$) were recorded every minute. HR was derived from a 12-lead ECG (ErgoCard, Medisoft, Sorinnes, Belgium). For $[lactate]_b$, a blood drop (10 µL) was taken from the earlobe and tested extemporaneously within 15-20 s (Lactate Scout+, EKF diagnostics, Cardiff, UK). Exercise was stopped as soon as $[lactate]_b$ was ≥ 4 mmol·L^{-1}. HR at the first lactate threshold (LT1) and at 2.5 mmol·L^{-1} of $[lactate]_b$ were determined. Three times a week, patients performed 30-min moderate-intensity cycling exercises, for 8 weeks. $[lactate]_b$ and HR were measured during training sessions. Data are mean±SD. HR and $[lactate]_b$ obtained during SIT were correlated using polynomial regressions. Standard errors of the estimate (SEE) to the regression line were calculated.

Figure 1 reports $[lactate]_b$ vs. HR curves (circles) obtained during SIT1 (and SIT2 for patients N and O). Mean R^2 of the $[lactate]_b$ vs. HR polynomial regressions was 0.954±0.056. Mean SEE values to the polynomial regression was 0.555±0.388 $mmol \cdot L^{-1}$. Figure 1 also reports $[lactate]_b$ and the associated HR measured during the training sessions (triangles). Mean SEE values of $[lactate]_b$ during training to the polynomial regression was 0.714±0.047 $mmol \cdot L^{-1}$. During training, no patient who displayed HR in the range between LT1 and 2.5 $mmol \cdot L^{-1}$ experienced $[lactate]_b \geq 4$ $mmol \cdot L^{-1}$.

The present study aimed to find a surrogate for $[lactate]_b$ to implement and widely disseminate endurance exercise training among SCD patients. If the conditioning strategy is to target an exercise intensity low enough to be safe and elevated enough to induce adaptations, an exercise intensity in between LT1 and 2.5 $mmol \cdot L^{-1}$ $[lactate]_b$ might be targeted.[4] A safety cut off should be set at 4 $mmol \cdot L^{-1}$ since thereafter blood lactate abruptly accumulates and associated acidosis may develop rapidly, especially in SCD.[4] We paid a particular attention to prevent lactate accumulation-associated acidosis, which constitutes a potentially major exercise-related triggering factor of HbS polymerization, sickling and VOC.[5]

A first possibility to implement endurance exercise would be to use the power output (PO) corresponding to a target $[lactate]_b$ obtained during SIT. However, this would oblige patients to exercise on a cycle ergometer so that any other forms of physical activity would be excluded.

A second possibility would be to use heart rate. In thirteen patients, $[lactate]_b$ and the associated HR recorded during training concurred with the correlation obtained during SIT1. In the two remainder patients, we noticed they did not adequately accustom with cycling during SIT1, contrary to the thirteen other patients who rapidly adapted. If data of SIT2 were taken into account for these two patients, the concordance was clear again (figure 1, panels N and O). As a

whole, all HR recorded during training sessions within the LT1 and 2.5 mmol·L^{-1} window were associated with $[lactate]_b$ close to the target values and never above 4 mmol·L^{-1} (the safety cut off).

Another possibility would have been to use patients' RPE. However, sensitivity of RPE appeared (at least in our population) too limited: several patients reported similar RPE for a wide range of PO crossing the LT1-2.5 mmol·L^{-1} window (figure 2). This large intra- and inter-individual variability may constitute a pitfall in the use of RPE as a mean to precisely manage exercise intensity during training sessions. However, further studies would be necessary to confirm this point.

Taken together, the present data indicate that HR appears to be an acceptable surrogate to implement endurance exercise, as long as patients' individual $[lactate]_b$ vs. HR relationship (obtained during SIT) is known and patients are accustomed to cycling exercise. To ensure safety and obtain benefit, an exercise intensity objectified by HR ranged between LT1 and 2.5 mmol·L^{-1} obtained during SIT could be used. Further prospective studies would be needed i) to confirm the accuracy of heart rate as a surrogate for $[lactate]_b$ during endurance training of SCD patients, and ii) to determine the frequency with which SIT must be repeated to take into account the improvements/changes induced by endurance training.

Acknowledgments

This work was supported in part by research funding from “l’association l’ar•mony”.

Authorship

Contribution: L.A.M., F.G., L.F. and P.B. designed and conducted this study. M.R. and B.C. analyzed data. M.R. created the figures. L.A.M. wrote the first draft of the article. All authors critically reviewed the draft and approved the final version for publication.

Conflict-of-interest disclosures

L.A.M. receives/ed gifts and consulting fees from Addmedica and bluebirdbio, respectively. P.B. receives/ed grants and/or consulting fees from Addmedica, bluebirdbio, Emmaus, Fondation Fabre, GBT, Hermanext, Novartis and Roche. All are outside the submitted work.

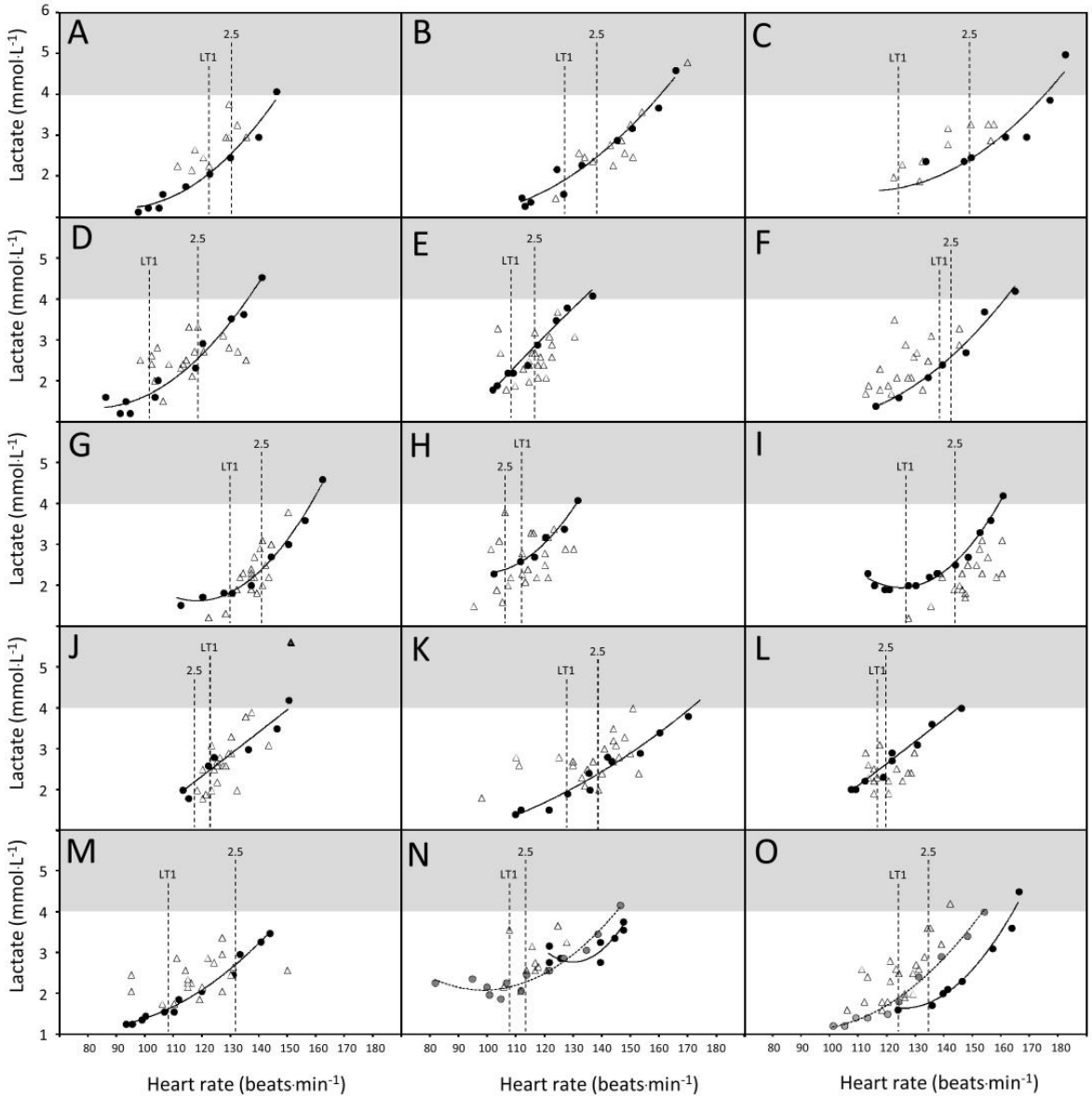
References

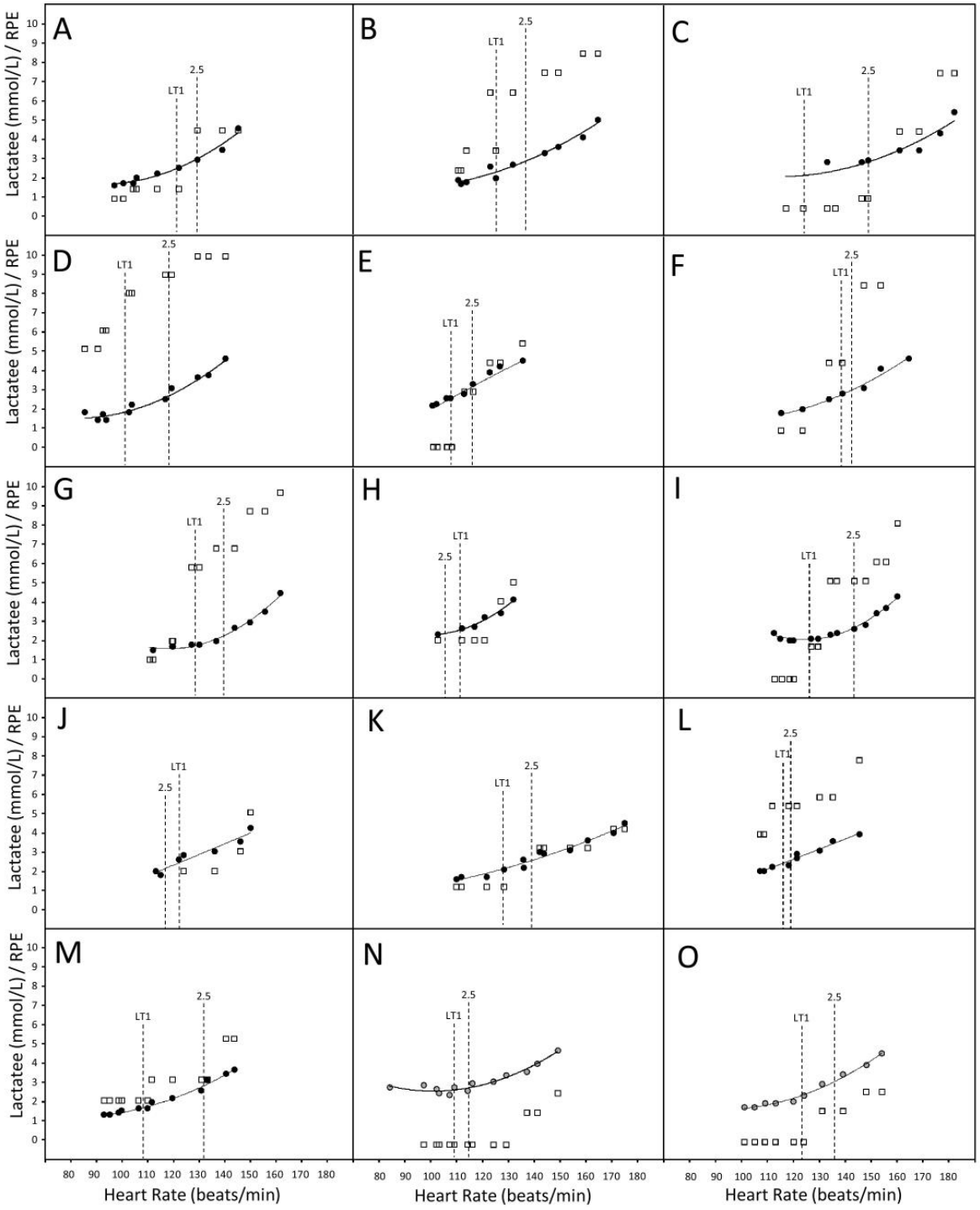
1. Bartolucci P, Habibi A, Khellaf M, et al. Score predicting acute chest syndrome during vaso-occlusive crises in adult sickle-cell disease patients. EBioMedicine. 2016;10:305-311.
2. Gellen B, Messonnier LA, Galacteros F, et al. Moderate-intensity endurance-exercise training in patients with sickle-cell disease without severe chronic complications (exdre): An open-label randomised controlled trial. Lancet Haematol. 2018;5(11):e554-e562.
3. Merlet AN, Messonnier LA, Coudy-Gandilhon C, et al. Beneficial effects of endurance exercise training on skeletal muscle microvasculature in sickle cell disease patients. Blood. 2019;134(25):2233-2241.
4. Messonnier LA, Gellen B, Lacroix R, et al. Physiological evaluation for endurance exercise prescription in sickle cell disease. Med Sci Sports Exerc. 2019;51(9):1795-1801.
5. Chatel B, Messonnier LA, Bendahan D. Do we have to consider acidosis induced by exercise as deleterious in sickle cell disease? Exp Physiol. 2018;103(9):1213-1220.

Figure Legends

Figure 1: $[lactate]_b$ vs. HR relationship obtained during SIT1 (black circles) and SIT2 for two patients (grey circles, panels N and O), as well as the $[lactate]_b$–HR pairs measured during the training sessions (open triangles). HR at the first lactate threshold (LT1) as well as at 2.5 $mmol \cdot L^{-1}$ are also reported (vertical dotted lines).

Figure 2 $[lactate]_b$ vs. HR relationship obtained during SIT1 (black circles) or SIT2 for two patients (grey circles, panels N and O), as well as the RPE values obtained during the same trials (open squares). HR at the first lactate threshold (LT1) as well as at 2.5 $mmol\,L^{-1}$ are also reported (vertical dotted lines).


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
LT1
2.5
Lactate (mmol·L-1)
Heart rate (beats·min-1)
80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180
1 2 3 4 5 6


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
LT1
2.5
Lactatee (mmol/L) / RPE
Heart Rate (beats/min)

PROTOCOLE D'EXTRACTION POUR DOSAGE ENZYMATIQUE

Le tampon mannitol est utilisé pour l'extraction protéique.

- Protocole de préparation du tampon mannitol (300 mL) : Peser 12,3 g de tampon D-mannitol – Peser 363 mg de Tris HCl – Peser 7,68 g de saccharose – Déposer 60 µl d'une solution à 0,5M d'EDTA (peser 18,61 mg d'EDTA dans 100 µl d'eau distillée pour obtenir une solution à 0,5 M d'EDTA) – Diluer l'ensemble avec 240 ml d'eau distillée – Ajuster le pH à 7,2 et compléter le volume avec H2O jusqu'à 300 ml.

Attention, veiller à conserver la chaîne du froid tout au long du protocole.

- Pesée du fragment musculaire
- Ajout du tampon mannitol (20µl/mg muscle)
- Broyage à l'ultra-thurax (3*15 sec à vitesse maximale), nettoyage intégral de la tige de l'ultra-thurax avec 3 bains d'eau distillée à chaque nouveau fragment musculaire,
- Centrifugation (20 min à 650 g)
- Séparation du surnageant et du culot,
- Ajout de tampon mannitol au culot restant et homogénéisation
- Broyage à l'ultra-thurax (3*15 sec à vitesse maximale) de la solution tampon mannitol/culot, nettoyage intégral de la tige de l'ultra-thurax avec 3 bains d'eau distillée à chaque nouveau fragment musculaire,
- Centrifugation de la solution tampon mannitol/culot (20 min à 650 G – Récupération du surnageant obtenu suite à la 2nde centrifugation, et regroupement avec le surnageant obtenu à la 1ère centrifugation.

Dosage de la concentration protéique. Pour éviter un cycle de congélation supplémentaire le dosage de la concentration protéique des échantillons est réalisé le même jour que l'extraction protéique et repose sur le principe de mesures d'absorbances comparatives avec une gamme BSA de différentes concentrations connues.

Procédé général. Dans chaque puit, 10 µl d'échantillon musculaire ou de solution de BSA (Bovin Albumin Serum) et 200 µl d'une solution spécifique du kit sont déposés. Cette solution spécifique est obtenue par le mélange d'un réactif A dans un réactif B avec une dilution au

1/50ème qui proviennent du kit de dosage des protéines Thermo Scientific™. La plaque incube à 37°C dès lors que la solution spécifique (kit) entre en contact avec les échantillons déposés et la mesure d'absorbance est effectuée à 15 minutes d'incubation.

Gamme d'étalonnage. La gamme d'étalonnage est réalisée avec des solutions de BSA de différentes concentrations connues (0 µg/µl, 0,4 µg/µl, 0,8 µg/µl, 1,2 µg/µl, 1,6 µg/µl, 2 µg/µl) en déposant 10 µl de solution par puit mesurés en triplicatas.

Échantillons musculaires. Le volume d'échantillon musculaire déposé dans les puits est de 10 µl/puit en triplicatas.

Calcul. L'extraction protéique étant réalisée avec un tampon mannitol, il est nécessaire de soustraire systématiquement la valeur d'absorbance obtenue pour le triplicata du tampon mannitol seul aux valeurs d'absorbances obtenues pour les échantillons musculaires. Cela permet de déduire la concentration protéique des différents échantillons musculaires grâce à la gamme d'étalonnage BSA. Le coefficient de corrélation R^2 moyen de la droite d'étalonnage est de 0,99 ; ce qui montre la précision de la gamme d'étalonnage assurant un calcul fiable de la concentration protéique des différents échantillons.

SPECTROPHOTOMETRIE : ENOLASE

L'énolase est une enzyme qui catalyse la conversion du 2-phospho-D-glycérate (2-PGA) en phosphoénolpyruvate au niveau de la neuvième étape de la glycolyse. Le dosage indirect de son activité repose sur le couplage à d'autres réactions qui aboutissent à l'oxydation du NADH dont la disparition est mesurée par absorbance à 340 nm à 37°C. La cinétique de disparition du NADH permet de calculer l'activité maximale de l'énolase.

Réactifs et solutions stocks.

- Tp imidazole 500 mM pH=6.8 (PM = 68.08 g/mol)

1.702 g QSP 50 mL H2O D. Ajustez à pH = 6.8 avec HCl.

- Tp Na_2CO_3 (PM=105.99 g/mol) / $NaHCO_3$; PM=84.1 g/mol)

1. Préparer du Na_2CO_3 160 mM (peser 169.6 mg QSP 10 mL H_2O distillée)
2. Préparer du $NaHCO_3$ 40 mM (peser 33.6 mg QSP 10 mL H_2O distillée)
3. Faire un mélange vol/vol des deux solutions. On obtient alors un Tp bicarbonate à pH=9.6 et les concentrations finales sont : Na_2CO_3 80 mM/ $NaHCO_3$ 20 mM.

- ADP 200 mM (PM=427.20 g/mol ; pH = 7)
- b-NADH 5 mM (PM = 790 g/mol)

Peser 3.95 mg de NADH QSP 1 mL de Tp bicarbonate pH=9.6.

- 2-PGA (PM=186.06) 20 mM conserver à -20°C
- BSA 2 mg/mL conserver à -20°C
- MgAcetate (PM=214.45g/mol) 1 M 21.5 g QSP 100 mL H_2O distillée
- KCl (PM= 74.55g/mol) 1 M 7.455 g QSP 100 mL H_2O distillée
- LDH (10 KU) : à diluer dans du glycérol.

14.1 mg/mL 1116 U /mg prot soit 15.7 U/mL (conserver à -20°C après aliquotage)

- PK (1 KU) : à diluer dans du glycérol

10 mg/mL soit ~400 U /mg prot soit ~4 U/mL (conserver à -20°C après aliquotage)

Préparation du milieu réactionnel. Commencer par préparer une solution « mix 5X » :

Solution stock	[]finale	1mL	5mL	10mL	20 mL
Tp imidazole 500 mM	250mM 1	0.5mL	2.5mL	5mL	10mL
Mg Acétate 1M	20mM	20 µL	100 µL	200 µL	400µL
KCl 1M	170mM	133.5 µL	667.5 µL	1335 µL	2670 µL
BSA 2 mg/mL (0.2%)	0.056%	284 µL	1.42 mL	2.84mL	5.68 mL
ADP 200mM	10 mM	50 µL	250 µL	500µL	1000 µL
PK 4 U/µL	15 U/mL ?	10 µL	50 µL	100 µL	200 µL
LDH 15 U/µL	25 U/mL ?	5 µL	25 µL	50 µL	100 µL

Le MR lui-même est constitué du mix 5X que l'on dilue (Mix1x) auquel on ajoute BSA, H_2O, NADH et PGA soit :

	1 ml de MR	2 mL	20 mL	30 mL	40 mL
Mix 5X	200 µL	400 µL	4 mL	6 mL	8 mL
BSA 2mg/ml	350 µL	700 µL	7 mL	10.5 mL	14 mL
H2OΔ	350 µL	700 µL	7 mL	10.5 mL	14 mL
β-NADH	100 µL	200 µL	2 mL	3 mL	4 mL

Dosage. Pour du muscle de souris, déposer 3 mL d'Hm au 1/30ème. Déposer dans l'ordre : 3 mL Hm au fond du puit puis 200 mL de MR. Agiter et incuber 5 min à 37°C. Faire une première lecture à 340 nm de la DO sur 4 minutes environ, l'activité non spécifique étant le blanc.

- Déclencher la réaction en ajoutant 20 mL de 2-PGA 20 mM.
- Lire toutes les 10 à 15 secondes pendant 6 min.
- Dosage en triplicat.

Si l'activité n'est pas linéaire, refaire le dosage en diluant les échantillons.

Calcul. Soustraire à l'activité enzymatique le blanc.

A partir de la pente correspondant à l'apparition ou à la disparition du cofacteur mesuré à une absorbance de 340 nm, l'activité volumétrique (AV) est déterminée et calculée à partir de la formule de la ***loi de Beer-Lambert*** **: AV (U/L) = a × V × D × v^{-1}× -1× d^{-1}**

a = coefficient de pente de la droite correspondant à l'apparition ou disparition du cofacteur (UDO/min) ; V = volume total du mélange réactionnel (L) ; D = facteur de dilution de l'échantillon ; v = volume d'extrait utilisé ; (L) = coefficient d'extinction du NADH ou du NADPH (6220 $M^{-1}.cm^{-1}$) ; d = largeur de la cuve ; U = 1 x10^6 mol/min.

L'activité spécifique enzymatique, exprimée en U/mg de protéines, est alors calculée en divisant AV par la concentration en protéine dans l'extrait déterminé par le kit BCA.

SPECTROPHOTOMETRIE : LACTATE DESHYDROGENASE

Le lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme qui catalyse la transformation du pyruvate en lactate, en association avec l'oxydation du NADH dont la disparition est mesurée à 340 nm.

Réactifs et solutions stocks.

Réactif	Stockage	Fabricant/fournisseur	Référence
Tampon imidazole	Temp ambiante	Sigma	I202
Na2CO3	Temp ambiante	Sigma	C7795
NaHCO3	Temp ambiante	Sigma	S8875
β-NADH	-20°C	Roche	10107735001
BSA	4°C	Sigma	A7030
KCl	Temp ambiante	Sigma	529552
pyruvate	4°C	Sigma	P2256

Préparation du milieu réactionnel.

- Tp imidazole (PM :68.08g/mol) 500mM pH=6.8 1.7 g imidazole + QSP 50mL H_2O distillée. Ajuster pH = 6,8.
- Tp bicarbonate (Na_2CO_3 PM :105.99g/mol & $NaHCO_3$ PM : 84.1g/mol).

1. Préparer Na_2CO_3 160mM : 169.6g + QSP 10mL H_2O distillée
2. Préparer Na_2CO_3 40mM : 33.6g + QSP 10mL H_2O distillée
3. Faire un mélange vol/vol de chaque solution. On obtient un Tp Na_2CO_3/$NaHCO_3$ de pH 9.6 avec [Na2CO3] finale=80mM & [$NaHCO_3$] finale=20mM.

- b-NADH (PM :790 g/mol) 5mM 3.95 mg de NADH + QSP 1 mL Tp Bicarbonate
- BSA 2mg/mL 2mg BSA + QSP 2 mL H_2O distillée, aliquoter et conserver à -20°C,
- KCl (PM : 74.55 g/mol) 1 M 7.455g KCl + QSP 100 mL H_2O distillée, aliquoter et conserver à 4°C dans un falcon.
- Pyruvate (PM : 110.04 g/mol) 1.25 M 1.11mg pyruvate + QSP 8 mL H_2O distillée, aliquoter et conserver à -20°C.

	1 mL de MR (5 puits)	2 mL de MR (10 puits)	5 mL de MR (25 puits)	10 mL de MR (50 puits)	20 mL de MR (100 puits)	[] finale
Tp imidazole	100 µL	200 µL	500 µL	1 mL	2 mL	50 mM
KCl	200 µL	400 µL	1 mL	2 mL	4 mL	200 mM
BSA 2mg/mL	350 µL	700 µL	1.750 mL	3.5 mL	7 mL	0.07%
β-NADH	100 µL	200 µL	500 µL	1 mL	2 mL	0.5 mM
pyruvate	120 µL	240 µL	600 µL	1.2 mL	2.4 mL	150 mM
$H_2O\Delta$	130 µL	260 µL	650 mL	1.5 mL	3 mL	

Dosage. Le MR doit être à 37°C. Pour du muscle de souris, déposer 5 mL d'Hm 1/30ème (soit environ 7-8 mg de protéines) au fond du puit, puis 200 mL de MR.

- Agiter à 37°C RAPIDEMENT.
- Lire immédiatement toutes les 10-15 sec pendant 3-4 min.
- Faire le dosage en triplicat.

Attention : l'activité est généralement linéaire seulement sur 3 ou 4 min.

	Pour 1 puits
Hm (µL)	5
MR (µL)	200
Agiter à 37°C rapidement. Lire immédiatement toutes les 10-15s pendant 3 à 4 min	

Calcul. Soustraire à l'activité enzymatique le blanc.

A partir de la pente correspondant à l'apparition ou à la disparition du cofacteur mesuré à une absorbance de 340 nm, l'activité volumétrique (AV) est déterminée et calculée à partir de la formule de la ***loi de Beer-Lambert*** **: AV (U/L) = a × V × D × v^{-1}× -1× d^{-1}**

a = coefficient de pente de la droite correspondant à l'apparition ou disparition du cofacteur (UDO/min)

V = volume total du mélange réactionnel (L)

D = facteur de dilution de l'échantillon

v = volume d'extrait utilisé

(L) = coefficient d'extinction du NADH ou du NADPH (6220 M^{-1}.cm-^{1})

d = largeur de la cuve

U = 1 x10^6 mol/min

L'activité spécifique enzymatique, exprimée en U/mg de protéines, est alors calculée en divisant AV par la concentration en protéine dans l'extrait déterminé par le kit BCA.

SPECTROPHOTOMETRIE : CITRATE SYNTHASE

La citrate synthase (CS) est une enzyme du cycle de l'acide citrique qui catalyse la réaction transformant l'acétylCoA en CoASH (CS). L'activité de la CS est donc mesurée en suivant l'apparition de la coloration jaune du milieu (412 nm).

Réactifs et solutions stocks.

- TRIS 1M pH=8 Tri Base Sigma T1503 ; PM = 121.14 g/mol)

12.1 g QSP 100 mL H_2O Δ. Ajustez à pH=8.0

- Acétyl-CoA 10 mM (Sigma A2181 PM = 809.57 g/mol)

25 mg Acétyl-CoA QSP 3 mL H_2O Δ. Aliquoter sous 180 µL dans des eppendorfs et conserver à -20°C.

- Acide oxaloacétique 10 mM (Sigma O4126 PM = 132.07 g/mol)

Peser au moins 2 mg d'oxaloacétate et diluer dans Tp Tris 1M pH=8.

- DTNB 5 mM (Sigma D8130 PM = 396.35 g/mol)

Préparer une solution à 1 mg diluée dans 0.505 mL d'éthanol 95%. Faire des aliquots de 500 µL à conserver à - 20°C.

- Triton-X100 10%

Compléter 1 mL de triton-X100 et QSP 10 mL avec H_2O Δ. Conserver à température ambiante dans un falcon de 15 mL.

Préparation du milieu réactionnel.

Stock	Vol à prélever					[] finale dans le
	1 mL de MR	5 mL	7 mL	10 mL	15 mL	MR
DTNB	21.5 µL	107.52 µL	1505.5 µL	215 µL	322.5 µL	107 µM
AcétylCoA 10 nM	32.3 µL	161.5 µL	226.1 µL	322.6 µL	484.5 µL	323 µM
Triton-X100 10%	10.8 µL	54 µL	75.6 µL	107.5 µL	162 µL	0.1 %
H_2O Δ QSP	935.4 µL	4677 µL	6515.9 µL	9354.9 µL	14031 µL	-

Dosage. Le MR doit être à 37°C. Pour du muscle de souris, déposer 6 à 10 µL d'Hm 1/30ème.
Déposer dans l'ordre : 6 µL Hm au fond du puit puis 200 µL de MR.
Agiter à 37°C RAPIDEMENT.

- Faire une première lecture à 412 nm de la DO sur 4 minutes environ (activité non spécifique = blanc)
- Déclencher la réaction en ajoutant 10 µL d'oxaloacétate 10 mM
- Lire toutes les 10 à 15 secondes pendant 4 – 5 minutes.
- Dosage en triplicat (si l'activité n'est pas linéaire, refaire le dosage en diluant les échantillons).

Calcul. Soustraire l'activité enzymatique du blanc.
A partir de la pente correspondant à l'apparition ou à la disparition du cofacteur mesuré à une absorbance de 340 nm, l'activité volumétrique (AV) est déterminée et calculée à partir de la formule de la ***loi de Beer-Lambert*** **: AV (U/L) = a × V × D × v^{-1}× -1× d^{-1}**

a = coefficient de pente de la droite correspondant à l'apparition ou disparition du cofacteur (UDO/min)
V = volume total du mélange réactionnel (L)
D = facteur de dilution de l'échantillon
v = volume d'extrait utilisé
(L) = coefficient d'extinction du NADH ou du NADPH (6220 M^{-1}.cm-^{1})
d = largeur de la cuve
U = 1 x10^{6} mol/min

L'activité spécifique enzymatique, exprimée en U/mg de protéines, est alors calculée en divisant AV par la concentration en protéine dans l'extrait déterminé par le kit BCA.

SPECTROPHOTOMETRIE : MYOKINASE & CREATINE KINASE

La myokinase (MK) est une enzyme qui catalyse l'interconversion d'ADP en ATP + AMP. La mesure de son activité maximale est évaluée à partir de l'apparition du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) dont l'absorbance est mesurée à 340 nm à 37°C. La cinétique d'apparition du NADPH permet de calculer l'activité maximale de MK. Pour mesurer les deux activités enzymatiques sur le même échantillon, il faut commencer par doser l'activité myokinase seule en mettant seulement de l'ADP dans le milieu réactionnel. Puis dans un second temps, on ajoute de la PCr afin de mesurer l'activité myokinase et CPK. On mesure l'apparition du NADPH à 340 nm qui est proportionnel à l'activité myokinase puis CPK.

Réactifs et solutions stocks.

Réactif	Stockage	Fabricant/fournisseur	Référence
HEPES	Temp ambiante	Sigma	H3375
Mg acetate	Temp ambiante	Sigma	M5661
glucose	Temp ambiante	Sigma	G8270
β-NADP	4°C	Roche	10128040001
ADP	-20°C	Sigma	O1905
HK	4°C	Roche	11426362001
G-6-PDH	4°C	Roche	10127671001
PCr	-20°C	Sigma	P1937

Préparation du milieu réactionnel.

- Tp HEPES (PM : 238.30 g/mol) 40mM pH=6,8 1.9 g HEPES + QSP 200mL H_2O distillée. Ajuster pH = 8.
- Glucose (PM :180.16 g/mol) 200 mM 360.3 mg de glucose + QSP 10 mL H_2O distillée.
- ADP (PM: 427.2 g/mol) 200 mM. Pour un pot de 1g : diluer dans 11.7mL de H_2O distillée. Aliquoter et conserver à -20°C.
- b-NADP, à peser le jour même.
- HK 1500 U/mL
- G-6-PDH 10 mg/2 mL avec environ 140 U/mg.
- PCr (PM :255.08 g/mol) 82mg/mL 321 mM

	1 mL de MR (5 puits)	2 mL de MR (10 puits)	5 mL de MR (25 puits)	10 mL de MR (50 puits)	20 mL de MR (100 puits)	[] finale
Tp HEPES	250 µL	500 µL	1.25mL	2.5 mL	5 mL	50 mM
Mg acetate	4 µL	8 µL	20 µL	40 µL	80 µL	200 mM
glucose	100 µL	200 µL	500 µL	1 mL	2 mL	0.07%
ADP	10 µL	20 µL	50 µL	100 µL	200 µL	0.5 mM
β-NADP	1.56 mg	3.12 mg	7.8 mg	15.6 mg	31.2 mg	150 mM
HK	4 µL	8 µL	20 µL	40 µL	80 µL	
G6PDH	2 µL	4 µL	10 µL	20 µL	24 µL	
$H_2O\Delta$	630 µL	1260 mL	650 mL	6.3 mL	12.6 mL	

Dosage. Le MR doit être à 37°C. Pour du muscle de souris, déposer 5 mL d'Hm 1/30ème (soit environ 7-8 mg de protéine) au fond du puit, puis 200 mL de MR

- Agiter à 37°C RAPIDEMENT
- Lire immédiatement toutes les 10-15 sec pendant 3-4 min.
- Faire le dosage en triplicat.

Attention : l'activité est généralement linéaire seulement sur 3 ou 4 min.

	Pour 1 puits
Hm (µL)	5
MR (µL)	200
Agiter à 37°C rapidement. Lire immédiatement toutes les 10-15s pendant 3 à 4 min	

Calcul. Soustraire à l'activité enzymatique le blanc.

A partir de la pente correspondant à l'apparition ou à la disparition du cofacteur mesuré à une absorbance de 340 nm, l'activité volumétrique (AV) est déterminée et calculée à partir de la formule de la ***loi de Beer-Lambert*** **: AV (U/L) = a × V × D × v^{-1}× -1× d^{-1}**

a = coefficient de pente de la droite correspondant à l'apparition ou disparition du cofacteur (UDO/min) ; V = volume total du mélange réactionnel (L) ; D = facteur de dilution de l'échantillon ; v = volume d'extrait utilisé ; (L) = coefficient d'extinction du NADH ou du NADPH (6220 M^{-1}.cm-^{1}) ; d = largeur de la cuve ; U = 1 x10^{6} mol/min.

L'activité spécifique enzymatique, exprimée en U/mg de protéines, est alors calculée en divisant AV par la concentration en protéine dans l'extrait déterminé par le kit BCA.

PROTOCOLE D'EXTRACTION POUR WESTERN BLOT

Préparer la poudre de muscle. Mettre de l'azote autour du bol, y faire tremper aussi le pilon + les échantillons ; y mettre le muscle et l'écraser ; diviser la poudre en parties souhaitées et la rajouter dans chacun des tubes de 2 mL ; congeler à -80° si on ne l'utilise pas directement.

Homogénat. Dans un tube de 2mL : partie du muscle en poudre écrasé/ refroidit à l'azote + 250uL tampon RIPA (NA Cl 150 mM + nonidet P40 (non ionic détergent) 1% + déoxycholate de sodium (ion détergent) 0,5% + SDS 0,1% + hépes Ph 7,4 50 mM + EDTA 5 mM). Rajouter pendant l'extrait une tablette Complete TM EDTA free phosphate inhibitor cocktail + 250 uL billes céramiques.

Tissue lyser. 5 x 10 secondes à 30 Hz, 10'' au froid entre temps. Laisser reposer à 4° dans la support-glace pendant 15' minutes.

Centrifugeuse. 10 minutes, - 10 000 g à 4°C, attention à bien répartir les échantillons.
Récupération de la phase du milieu à aliquoter.

Dosage. Identique au protocole d'extraction pour dosage enzymatique. N.B : utilisation du RIPPA pour le Western Blot et non pas du Mannitol pour l'activité enzymatique.

WESTERN BLOT

Préparation des échantillons. D'après le calcul du dosage de protéine obtenu sur Excel, utiliser le classeur pour calculer les doses nécessaires pour combiner les protéines avec le RIPPA, le tampon Laemmli et Mercapto pour faire les bleus. Chauffer pendant 3 minutes à 100°C.

Migration Les protéines ont été séparées par TGS-DS 10x (100mL de TGSDS + 900mL d'eau distillée) pendant 40 minutes environ à une intensité constante de 200 Volt.

Transfert. Ces protéines ont ensuite été transférées dans le Transblot sur des membranes PVDF avec le programme « Mixt » 7 minutes. A la sortie découper les membranes en fonctions des protéines à analyser : Partie haute (75 et +) jusqu'à 40/50 kDa pour les MCT, les CA entre 15-37 kDa.

Blocage & Conjugaison. Bloquer les membranes pendant 1h dans une solution de lait (5% de régilait dilué dans du TBST). Incuber les membranes à 4°C pendant la nuit avec l'un des anticorps dilués dans du lait (5% de regilait dilué dans du TBST). Laver 5 fois les membranes en rinçage flash dans du TBST. Incuber les membranes pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-rabbit (A6154 ; Sigma-Aldrich) ou anti-mouse (GOAT ANTI MOUSE REF STARI 17P, Biorad). Laver de nouveau 5 fois les membranes en rinçage flash dans du TBST.

Références anticorps primaire. Expérimentation chez l'homme : MCT1 (BOSSBS-10249R, 1:500, VWR), MCT2 (ab182178, 1:750, Abcam), MCT4 (ab234728, 1:750, Abcam), CAII (ABGEAP7307B, 1:250; VWR), CAIII (BSBTPA1439, 1:2000, VWR), CAIV (H00000762-B02P, 1:250; Abnova), NHE1 (ab67314, 1:250, Abcam), NBC (BOSSBS-10249R, 1:250; VWR). Expérimentation chez la souris : MCT1 (H00006566-B01P, 1:1 000, Novus), MCT4 (ab74109, 1:750, Abcam), et CAII (BIRBORB10230, 1:250, VWR).

Révélation. Révélation à l'ECL avec le kit Western blot ECL-Plus (Clarity Western ECL Blotting Substrate). Déposer la solution d'ECL pendant 5 min sur les membranes. Faire les photos avec le ChemiDoc TM XRS + (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Le logiciel ImageLab (Image Lab Software, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a été utilisé pour les quantifications.

PROTOCOLE IMMUNO-HISTOLOGIE CD31

Préparations antérieures.

- Sortir les lames et les laisser sécher 1h à T° ambiante

Pendant séchage des lames :

- Préparer une solution de PBS dans de l'eau distillée (900 mL ed pour 100 mL PBS)
- Préparer du TSAB : 2,5 mL de BSA pour 50mL de tampon Tris
- Préparer une chambre humide
- Préparer des morceaux de parafilm pour les coupes à étudier.

Déroulé.

- Une fois séchées, mettre les lames 15-20' dans l'acétone
- Mettre les lames 5' dans les TSAB (150 uL/lame) et laisser sécher.
- Déposer l'anticorps primaire – CD31 (Anti-mouse CD31 390 pur 500 µG, Thermo Fisher) conseillé à 1/20ème, laisser les lames en chambre humide, overnight à 4°C.
- Le lendemain – Rincer les lames dans le tampon Tris 10x
- Déposer les lames 5' dans le TSAB – Pendant ce temps préparer l'anticorps secondaire dilué dans une TSAB (1/500ème)
- Sécher les lames
- Déposer l'anticorps secondaire (150 uL/lame) – Incuber pendant 1h.
- Rincer les lames dans le tampon Tris 1x10

Coloration DAB – Chromogène. Utilisation du kit liquide DAB+ substrat Chromogen System.

- Ajouter une goutte ou 20 uL de DAB- Chromogène par mL de tampon-substrat (pour 12 lames environ 2mL de substrat, 40uL de chromogène) – Attention solution à utiliser dans les 5J et à conserver au frigo.
- Déposer la solution de DAB sur les lames et laisser 30'' pour le CD31
- Rejeter le DAB dans un récipient contenant de la javel
- Rincer les lames sous l'eau pendant 10'
- Déshydratation et montage à l'eukit : mettre les lames dans l'alcool 95- 1' dans xylène.

RESUME

Avec environ 5 millions de personnes atteintes, la drépanocytose est la maladie génétique la plus répandue au monde. C'est une hémoglobinopathie due à une mutation du gène codant pour la bêta-globine et conduisant à la synthèse d'hémoglobine anormale S (HbS). En condition désoxygénée, l'HbS peut polymériser et le globule rouge peut alors prendre la forme d'une faucille. Les érythrocytes falciformes étant fragiles et rigides, les principales manifestations cliniques sont une anémie hémolytique chronique et des crises vaso-occlusives. Leurs répercussions directes ou indirectes sur les organes vitaux sont majeures et le muscle strié squelettique n'est pas épargné (remodelage microvasculaire, structural et énergétique). La littérature montre des différences physiopathologiques entre les deux sexes, les femmes SCD semblant sur certains aspects cliniquement moins fragiles que les hommes. Toutefois, la traduction de ces différences au niveau musculaire reste inconnue. Le 1er objectif de ce travail de thèse a été de comparer les caractéristiques microvasculaires, structurales et énergétiques du muscle vastus lateralis de sujets féminins et masculins, sains, porteurs du trait drépanocytaire (SCT) et patients homozygotes SCD. L'hypothèse testée était que le remodelage musculaire observé chez les hommes serait atténué chez les femmes. Contrairement à nos hypothèses, les résultats ont montré que la densité du réseau microvasculaire et la surface des micro-vaisseaux sont plus affectées chez les femmes SCD que chez les hommes SCD. Les patients drépanocytaires sont caractérisés par une faible aptitude physique, une augmentation rapide du lactate à l'exercice et une pente de la relation $\dot{V}O_2$/puissance altérée liées entres autres à des défauts d'approvisionnement et d'utilisation musculaire de l'oxygène. L'entraînement en endurance étant connu pour i) améliorer les mécanismes d'apport et d'utilisation musculaire de l'oxygène et ii) modifier l'utilisation des substrats énergétiques, le 2ème objectif de ce travail a été de tester l'hypothèse selon laquelle l'entraînement en endurance chez les patients SCD améliorerait la pente de la relation $\dot{V}O_2$/puissance et leur flexibilité métabolique. Si la première hypothèse est validée, les résultats concernant une restauration de la flexibilité métabolique des patients sont mitigés. La souris Townes est actuellement le modèle murin qui développe la physiopathologie la plus similaire à celle observée chez l'Homme. L'objectif de cette 3ème étude était de mettre en évidence les similitudes et les différences dans le remodelage du muscle strié squelettique entre des sujets contrôles, des patients SCD et SCT, et des souris Townes contrôles, SCD et SCT. L'hypothèse testée est que le remodelage musculaire observé chez l'Homme l'est également chez la souris. Les résultats n'ont révélé aucune différence significative entre les souris Townes SCD, SCT et contrôles contrairement aux résultats observés chez l'Homme, soulignant des limites du modèle murin à reproduire la physiopathologie observée chez l'homme. Pour améliorer le profil clinique et la qualité de vie des patients SCD, l'hydroxyurée (HU) est une approche thérapeutique privilégiée car elle réveille la production d'hémoglobine fœtale, réduit l'hémolyse et l'anémie, et améliore l'hémodynamisme. Cependant, les bénéfices et effets spécifiques de ce traitement, combiné ou non à de l'entraînement en endurance, sur le muscle restent encore méconnus. Ainsi, le 4ème objectif était de déterminer l'influence de l'HU sur les caractéristiques microvasculaires, structurales et énergétiques du muscle strié squelettique de souris Townes SCD, testant l'hypothèse que les défauts observés chez les souris sans traitement seraient amoindris chez les souris traitées. Les résultats mettent en évidence que les souris sous HU ont un diamètre, une aire et un périmètre de capillaires plus élevés que les souris sans traitement.

With approximately 5 million people affected, sickle cell disease is the most genetic disease in the world. It is a hemoglobinopathy due to a mutation of the gene coding for beta-globin and leading to the synthesis of abnormal hemoglobin S (HbS). In deoxygenated condition, the HbS can polymerize and the red blood cell can take the shape of a sickle. Since sickled erythrocytes are fragile and rigid, the main clinical manifestations are chronic hemolytic anemia and vaso-occlusive crises. Their direct or indirect reactions on the vital organs are major and the striated skeletal muscle is not spared (microvascular, structural and energetic remodeling). The literature shows physiopathological differences between the two sexes, with SCD women appearing in certain aspects to be clinically less fragile than men. However, the translation of these differences at the muscular level remains unknown. The first objective of this thesis work was to compare the microvascular, structural and energetic characteristics of the vastus lateralis muscle of healthy female and male subjects, carriers of sickle cell trait (SCT) and homozygous SCD patients. The hypothesis tested was that the muscle remodeling observed in men would be attenuated in women. Contrary to our hypotheses, the results showed that the density of the microvascular network and the surface area of the micro vessels are more affected in SCD women than in SCD men. Patients with sickle cell disease are characterized by poor physical fitness, a rapid increase in lactate on exercise and an altered slope of the $\dot{V}O_2$/power relationship linked, among other things, to defects in the supply and use of oxygen in the muscles. Since endurance training is known to i) improve the mechanisms of muscular oxygen supply and use and ii) modify the use of energy substrates, the 2nd objective of this work was to test the hypothesis according to that endurance training in SCD patients would improve the slope of the $\dot{V}O_2$/power relationship and their metabolic capacity. If the first hypothesis is validated, the results concerning a restoration of the weighted flexibility of the patients are mixed. The Townes mouse is currently the mouse model that develops the pathophysiology most similar to that which appears in humans. The objective of this 3rd study was to highlight the similarities and differences in skeletal muscle remodeling between control subjects, SCD patients and SCT carriers, and control Townes mice, SCD and SCT. The hypothesis tested is that the muscle remodeling observed in humans is also observed in mice. The results revealed no significant difference between Townes SCD, SCT mice and different controls to the results observed in humans, revealed limitations of the mouse model in reproducing the pathophysiology seen in humans. To improve the clinical profile and quality of life of SCD patients, hydroxyurea (HU) is a preferred therapeutic approach as it awakens fetal hemoglobin production, reduces hemolysis and anemia, and improves hemodynamics. However, the specific benefits and effects of this treatment, whether or not combined with endurance training, on muscle still remain unknown. Thus, the 4th objective was to determine the influence of HU on the microvascular, structural and energetic characteristics of the skeletal muscle of Townes SCD mice, testing the hypothesis that the defects observed in mice without treatment would be lessened in mice with HU. The results show that the mice under HU have a diameter, an area and a perimeter of capillaries higher than the mice without treatment.