



Analyse histologique des répercussions musculaires, structurales, énergétiques et microvasculaires chez des hommes et des femmes drépanocytaires

Marion Ravelojaona

► **To cite this version:**

Marion Ravelojaona. Analyse histologique des répercussions musculaires, structurales, énergétiques et microvasculaires chez des hommes et des femmes drépanocytaires. Physiologie [q-bio.TO]. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2014. Français. <NNT : 2014STET003T>. <tel-01172228>

HAL Id: tel-01172228

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01172228>

Submitted on 7 Jul 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ JEAN MONNET SAINT ETIENNE

Faculté de Médecine Jacques LISFRANC
Ecole Doctorale : SCIENCES, INGENIERIE, SANTE
Laboratoire de Physiologie de l'Exercice (E.A. 4338)

THÈSE DE SCIENCES

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat

Domaine : Biologie Médecine Santé
Spécialité : Biologie et Physiologie de l'Exercice

Présentée et soutenue publiquement le 11 Juillet 2014 par

Marion RAVELOJAONA

Analyse histologique des répercussions musculaires structurales, énergétiques et microvasculaires chez des hommes et des femmes drépanocytaires

Directeurs de thèse :

Dr Léonard FÉASSON, MCU-PH, HDR, Université Jean Monnet, St Etienne
Pr Laurent MESSONNIER, PU, Université de Savoie, Le Bourget-du-Lac

Jury composé de :

Pr Frédéric GALACTÉROS, PU-PH, AP-HP Hôpital Henri Mondor, Rapporteur
Pr Nathalie KOULMANN, PU, IRBA, Rapporteur
Dr Cyril MARTIN, MCF, HDR, Université de Lyon I, Examineur
Dr Nathalie STREICHENBERGER, MCU-PH, CHU Lyon Est, Examineur

Remerciements

Great moments, are born from great opportunity, Herb Brooks, 1980

La thèse, c'est avant tout une expérience humaine, alors comment ne pas commencer naturellement **mes remerciements** par mes deux directeurs qui m'ont offert cette opportunité et m'ont ainsi permis de vivre cette belle aventure de 3 ans.

Laurent, pour être complètement honnête, tu es la première raison de ma venue à St Etienne. Tu m'as persuadée de venir à St Etienne, de Berkeley après un passage éclair par Paris...me convaincre n'était pas tâche facile, mais je n'ai aujourd'hui pas l'ombre d'un regret! Un grand merci pour ton encadrement, ton implication, ton partage et ta disponibilité malgré que tu ne sois pas sur place...et que je ne t'appelle pas souvent, oups!

Léo, je ne sais pas par où commencer...tu m'as reçue les bras ouverts en Master 2, et tu as mis en œuvre tous les moyens pour que je sois exceptionnellement intégrée et que j'apprécie TA région...et bien tu as brillamment réussi!! Merci pour tout, pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ta disponibilité, et toutes nos discussions passionnées, scientifiques, mais pas seulement, et heureusement! Merci également à ta famille (Sèv, Marcellin et Angie) de m'avoir accueillie chaleureusement.

Un très grand merci à vous deux pour la confiance et l'autonomie que vous m'avez accordées au cours de ces années. Travailler avec vous a été une chance immense, vous avez su créer un excellent environnement, à l'origine du « succès » de mes travaux.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres du jury.

A **M. le Professeur Frédéric Galactéros** qui m'a fait l'honneur de bien vouloir rapporter mon travail. Merci également pour tous vos conseils (déjà depuis le Master 2) et votre disponibilité lors des congrès.

A **Mme. le Professeur Nathalie Koulmann** qui a accepté spontanément d'évaluer et commenter ce manuscrit.

Au **Dr Nathalie Streichenberger** et au **Dr Cyril Martin** pour leur jugement sur ce manuscrit.

Je tiens bien sûr à remercier l'ensemble des membres du **Pavillon 9**. Mention spéciale à tous mes collègues de bureau, à commencer par **Lulu**. Merci pour ce passage de témoin grandiose, ton aide perpétuelle même au pays des *Gophers* (au fond de toi tu étais quand même pour les *Bears*!!), et ton soutien. Oh combien nos pauses thé/café – carrés de chocolats étaient méritées! Sans oublier mes derniers compagnons **Jérémy** et **Laure**, qui auront rendu cette fin de thèse bien plus agréable grâce à nos discussions aussi bien scientifiques que personnelles mais toujours aussi enrichissantes et passionnantes!

Le travail de thèse est un travail d'équipe, et je tiens à remercier **Domi** et **Marie** pour leur aide précieuse à la paillasse et les *papotages* qui sont toujours les bienvenus surtout lors des 3 fois 5 minutes de rinçage (!!), **Philippe** grâce à qui je suis (presque) devenue une pro d'Excel, **Rodolphe** toujours présent pour m'aiguiller en informatique et **Régis aka MacGyver** qui m'aura rendu de nombreux services.

Un grand merci à **Rodgeur** qui a bien pris soin de moi pendant ces années, car oui, j'en ai eu des pépins! Je remercie également le **Professeur André Geysant** pour ses discussions toujours aussi pertinentes. Merci également à **Marion** pour sa gentillesse, son écoute et tous

ces bons moments passés ensemble. Merci aussi à mes collègues doctorants, en particulier **John** (*life wouldn't have been the same without you!!*), **An**, **Kara** et **PiéPié** le parisien!!

Petit clin d'œil à mes amis du **tennis** bien sûr. A **Jean-Luc** qui m'a transmis sa passion pour la physiologie, et puis notamment à la fine équipe du Racing, en particulier **Miss cc**, **Tres Santos** et **Camille**, sans oublier notre cher capitaine bien aimé **Pat**! C'était toujours un plaisir de se retrouver au printemps pour les matches par équipe, rien de mieux pour se changer les idées et partager des moments inoubliables, alors merci! Je ne saurais oublier **Claire** et **Marina**, toujours présentes pour de bonnes rigolades!!

Un merci tout particulier à **Sébastien** de m'avoir supportée quotidiennement (surtout dans la dernière ligne droite...pas toujours d'humeur égale!!), de m'avoir épaulée dans les moments de doute, de m'avoir écoutée, d'avoir toujours eu le mot pour me faire sourire. Merci pour ton soutien sans faille et ta bonne humeur contagieuse!!

Je tiens bien évidemment à remercier ma famille...merci à mes **parents** et mes **sœurs** (mention spéciale pour **Eve**, qui malgré le décalage horaire et les milliers de kilomètres était toujours là pour moi), qui même s'ils ne comprenaient pas toujours ce que je faisais m'ont toujours encouragée et soutenue dans ce projet...et celui à venir!!

TABLE DES MATIÈRES

Liste des abréviations	7
Liste des tableaux	9
Liste des figures	10
REVUE DE LITTÉRATURE	12
I. LA DRÉPANOCYTOSE	13
I.1. Définition et épidémiologie	13
I.2. Génétique et physiopathologie	14
<i>I.2.a. Génétique</i>	14
<i>I.2.b. Polymérisation de l'hémoglobine S et falciformation des globules rouges</i>	16
<i>I.2.c. Conséquences liées au taux d'hémoglobine fœtale (HbF)</i>	22
I.3. Présentation « clinique »	24
<i>I.3.a. Sujets SCA</i>	24
<i>I.3.b. Sujets SCT</i>	26
I.4. Circulation vasculaire et HbS	27
<i>I.4.a. Le globule rouge drépanocytaire</i>	27
<i>I.4.b. L'adhésion vasculaire</i>	28
<i>I.4.c. L'altération du tonus vasculaire</i>	29
<i>I.4.d. Hyperplasie vasculaire de l'intima : occlusion vasculaire</i>	30
I.5. Différence hommes/femmes dans la drépanocytose	31
II. EXPLORATION DU MUSCLE STRIÉ SQUELETTIQUE	34
II.1. Organisation structurale du muscle	34
<i>II.1.a. Différents types de fibres musculaires</i>	35
<i>II.1.b. Régénération et dégénérescence musculaire</i>	36
II.2. Potentiel énergétique musculaire	37
<i>II.2.a. L'adénosine triphosphate (ATP)</i>	37
<i>II.2.b. Les phosphagènes</i>	39
<i>II.2.c. Métabolisme des hydrates de carbone</i>	40
<i>II.2.d. Métabolisme des lipides</i>	45
<i>II.2.e. Conclusion sur le métabolisme énergétique musculaire et interconnexion entre métabolismes glucidique et lipidique</i>	46
II.3. Réseau microvasculaire du muscle et son étude	47
<i>II.3.a. Artères et artérioles</i>	48
<i>II.3.b. Capillaires</i>	51
<i>II.3.c. Veinules et veines</i>	55
<i>II.3.d. Facteurs angiogéniques</i>	56

II.3.e. Etude de la microvascularisation du muscle : indices de capillarisation	57
III. RÉPERCUSSIONS MUSCULAIRES DE LA DRÉPANOCYTOSE HÉTÉROZYGOTE ET HOMOZYGOTE	63
III.1. Répercussions musculaires chez les sujets SCT	63
III.1.a. Répercussions sur l'aptitude physique	63
III.1.b. Répercussions sur le tissu musculaire et son réseau microvasculaire	63
III.2. Répercussions musculaires suspectées chez les sujets SCA	64
IV. HYPOTHÈSES	66
IV.1. Remodelage structurale	66
IV.2. Métabolisme énergétique	66
IV.3. Remodelage microvasculaire	67
IV.4. Effet genre	67
OBJECTIFS	69
MATERIEL ET METHODES	71
I. POPULATION ETUDIEE	72
II. MÉTHODES	74
II.1. Muscle étudié à partir de la biopsie musculaire	74
II.2. Analyses histologiques	75
II.2.a. Analyse structurale et indice de remodelage musculaire	75
II.2.b. Enzymologie et activité Cox	78
II.2.c. Indice de remodelage microvasculaire	80
II.2.d. Analyses des parois microvasculaires	81
II.2.e. Analyse statistique	81
ETUDE 1	82
I. Introduction à l'étude 1	83
II. Article 1	84
Sickle cell disease profoundly affects skeletal muscle and its microvasculature, Ravelojaona et al., 2014.	84
III. Discussion et Conclusion	113
III.1. Donnée anthropométriques, hématologiques et hémoglobiniques	113
III.2. Remodelage microvasculaire	113
III.3. Remodelage structural	116
III.4. Remodelage énergétique	118
III.5. Conclusion	119
ETUDE 2	120
I. Introduction à l'étude 2	121
II. Article 2	122

Structural, energetic and microvascular repercussions of sickle cell disease on women muscle: women respond differently from men, Ravelojaona et al., 2014.	122
III. Discussion et Conclusion	150
III.1. Données anthropométriques et hématologiques	150
III.2. Remodelage microvasculaire, structural et énergétique du muscle squelettique des femmes drépanocytaires	150
III.3. Effet genre	151
<i>III.3.a. Données anthropométriques et hématologiques</i>	<i>151</i>
<i>III.3.b. Remodelage structural et énergétique</i>	<i>151</i>
<i>III.3.c. Remodelage microvasculaire</i>	<i>152</i>
III.4. Conclusion	154
CONCLUSION	155
PERSPECTIVES	158
BIBLIOGRAPHIE	162
ANNEXES	180
I. Communications orales	181
II. Communications affichées	181
III. Fiches méthodologiques	182

Liste des abréviations

ADP : Adénosine DiPhosphate

AGL : Acide Gras Libre

AMP : Acide MonoPhosphate

ANOVA : Analyse de la variance

Anticorps A4 : Anticorps monoclonal dirigé contre les chaînes lourdes de myosine de type I

Anticorps N2 : Anticorps monoclonal dirigé contre les chaînes lourdes de myosine de type IIa

ATP : Adénosine TriPhosphate

ATPase : ATP synthétase

AVC : Accidents Vasculaires Cérébraux

BPCO : Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive

β -HAD : β -Hydroxyacyl-CoA-Déshydrogénase

CAF : Nombre de capillaires par fibre (*Capillary per Fiber*)

CAFA : CAF/surface de section de la fibre (*CAF/Area*)

CapTor : Tortuosité Capillaire (*Capillary Tortuosity*), $SM/\pi(DEM/2)^2$

CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

CD56 : Anticorps monoclonal dirigé contre une épitope membranaire des cellules satellites

CDO : Courbe de Dissociation de l'Oxyhémoglobine

C/F : Capillary to Fiber ratio

CFPE : Capillary-to-Fiber-Perimeter Exchange ratio

CK : Créatine phosphoKinase

CoA : Coenzyme A

COD ou DEM : Diamètre Extérieur du Microvaisseaux (*Capillary Outer Diameter*)

COx : Cytochrome *c* Oxydase

CP : Périmètre des Capillaires

CS : Citrate Synthase

CSA : Surface des Microvaisseaux (*Capillary Surface Area*)

DC : Densité Capillaire (cap. mm^{-2})

ET-1 : Endothéline-1

FADH : Flavine Adénine Dinucléotide

Hb : Hémoglobine

HbA: Hémoglobine A (normale)
HbF: Hémoglobine F (fœtale)
HbS: Hémoglobine S (mutée)
Hct : Hématocrite
HIF-1 : Facteur induit par l'hypoxie-1 (*Hypoxia-Inducible Factor-1*)
HU : Hydroxyurée
ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule-1
Ki67 : Anticorps polyclonal dirigé contre les noyaux en prolifération
LC/PF : Longueur des Capillaires au contact d'une fibre/Périmètre de la Fibre
LDH : Lactate Déshydrogénase
LM : Longueur des Microvaisseaux
MHC : Chaîne lourde de myosine (*Myosine Heavy Chain*)
MMP : Métalloprotéinase matricielle (*Matrix MetalloProteinase*)
NADH : Nicotinamide Adénosine Dinucléotide
NO : Monoxyde d'azote (*Nitric Oxide*)
NOS : NO synthétase
P₅₀ : Pression partielle d'oxygène nécessaire pour saturer l'hémoglobine à 50% en oxygène
Pax7 : Anticorps monoclonal dirigé contre les noyaux des cellules satellites
PCr : PhosphoCréatine ou créatine phosphate
PFK : Phosphofructokinase
PM : Périmètre des Microvaisseaux
Pi : Phosphate inorganique
ROS : Espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)
SM : Surface des Microvaisseaux
SM-MHC : Smooth Muscle-Myosin Heavy Chain
Sujets CON/HbAA: Sujets contrôles, sains
Sujets SCA/HbSS : Sujets drépanocytaires (*Sickle Cell Anemia*), homozygotes pour la drépanocytose
Sujets SCT/HbAS : Sujets porteur du trait drépanocytair (*Sickle Cell Trait*), hétérozygotes pour la drépanocytose
TG : Triglycéride
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différents types d'hémoglobines chez l'adulte sain. D'après (Bernard <i>et al.</i> , 1998).....	17
Tableau 2 : Caractéristiques des 3 principaux types de fibres.	36
Tableau 3 : Population masculine étudiée.....	73
Tableau 4 : Population féminine étudiée.....	73
Tableau 5 : Interprétation des différents types de fibres à partir des méthodes ATPasique et immunohistochimique. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).....	76

Liste des figures

Figure 1 : Superposition des répartitions géographiques de l'allèle β^S et du <i>Plasmodium falciparum</i> .	13
Figure 2 : Distribution géographique des haplotypes drépanocytaires.	14
Figure 3 : Mise en évidence par électrophorèse de la migration d'HbA et d'HbS.	15
Figure 4 : Séquence d'acides aminés codant pour l'Hb normale (à gauche) et l'HbS (à droite). D'après (Griffiths <i>et al.</i> , 2000).	15
Figure 5 : Représentation du mode de transmission autosomique récessif du gène β^S à partir de deux parents hétérozygotes à la drépanocytose.	16
Figure 6 : Formation réversible d'un polymère d'HbS composé de 7 double brins hélicoïdaux d'hémoglobine S sous l'effet de la désoxygénation. D'après (Eaton et Hofrichter, 1987).	18
Figure 7 : Polymérisation de la désoxyhémoglobine S aboutissant à la falciformation du globule rouge.	19
Figure 8 : Représentation de globules rouges falciformés, appelés drépanocytes.	19
Figure 9 : Mécanisme physiopathologique de base de la drépanocytose. D'après (Labie et Elion, 2005).	20
Figure 10 : Courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine décalée vers la droite chez les sujets drépanocytaires. D'après (Berger et King, 1980).	21
Figure 11 : Evolution des différentes chaînes d'hémoglobine synthétisées. D'après (Bernard <i>et al.</i> , 1998).	23
Figure 12 : Courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine fœtale décalée vers la gauche.	24
Figure 13 : Microcirculation des globules rouges.	28
Figure 14 : Rôle majeur du NO dans la drépanocytose. D'après (Gladwin <i>et al.</i> , 2003).	33
Figure 15 : Organisation tissulaire du muscle strié squelettique.	34
Figure 16 : Position d'une cellule satellite (S) dans le muscle strié squelettique par rapport à un myonucléi (M). D'après (Roth <i>et al.</i> , 2000).	35
Figure 17 : Cycle de vie des cellules satellites.	37
Figure 18 : Structure chimique de l'ATP. D'après (Campbell et Reece, 2005).	38
Figure 19 : Hydrolyse de l'ATP. D'après (Campbell et Reece, 2005).	38
Figure 20 : Schéma de la glycogénolyse. D'après (Lehninger, 1979).	40
Figure 21 : Schéma de la glycolyse. D'après (Lehninger, 1979).	42
Figure 22 : Schéma du cycle de Krebs. D'après (Jones, 2005).	43
Figure 23 : Cytochromes dans la chaîne respiratoire mitochondriale. D'après (Widmaier <i>et al.</i> , 2008).	44
Figure 24 : Schéma de la β -oxydation. D'après (Vincent, 2010).	46
Figure 25 : Les trois sources de production d'ATP pendant la contraction musculaire. D'après (Widmaier <i>et al.</i> , 2008).	47
Figure 26 : Arborescence du réseau vasculaire dans le muscle squelettique. D'après (Myrhage et Eriksson, 1984).	48
Figure 27 : Représentation d'une artère et de ses trois couches concentriques. Copyright © Sanofi Aventis France.	49
Figure 28 : Représentation d'une artériole. D'après (Vincent, 2010).	50
Figure 29 : Structure d'un capillaire. D'après (Widmaier <i>et al.</i> , 2008).	52
Figure 30 : Représentation de la tortuosité capillaire en 2D et 3D. D'après (Hudlicka <i>et al.</i> , 2004).	52

Figure 31 : Circulation sanguine au niveau de la microcirculation. D'après (McHedlishvili et Maeda, 2001).....	54
Figure 32 : Diminution de l'hématocrite normalisée (hématocrite des microvaisseaux (H_{micro})/hématocrite systémique (H_{sys})) dans les vaisseaux à plus petits diamètres. D'après (Lipowsky <i>et al.</i> , 1980).	54
Figure 33 : Comparaison histologique entre une artère et une veine. D'après (Widmaier <i>et al.</i> , 2008).....	55
Figure 34 : Processus d'angiogenèse. D'après (Kalluri, 2003).....	57
Figure 35 : Calcul des indices DC et C/F. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).....	58
Figure 36 : Identification d'un microvaisseau au CD 31. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).....	59
Figure 37 : Calcul du CFPE. D'après (Hepple, 1997).	59
Figure 38 : Exemple de calcul des indices CAF et CAFA de fibres ayant des surfaces de section différentes. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).	60
Figure 39 : Calcul du LC/PF (Sullivan et Pittman, 1987). D'après (Charifi, 2006).	61
Figure 40 : Représentation de la limite de l'indice LC/PF dans l'analyse de la tortuosité. D'après (Vincent, 2010).....	61
Figure 41 : Prélèvement biopsique. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).	74
Figure 42 : Typologie du <i>vastus lateralis</i> par l'activité ATPasique 4,35 et 4,55 et par immunohistochimie : Ac A4 et Ac N2. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).	76
Figure 43 : Représentation de la méthode de mesure de la surface de section des fibres musculaires. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).....	77
Figure 44 : Représentation d'une fibre segmentée et d'internalisations nucléaires, témoins du potentiel régénératif. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).	77
Figure 45 : Cellules satellites marquées à l'anticorps CD56. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).....	78
Figure 46 : Préparation histoenzymatique COx sur une coupe transversale d'une biopsie issue d'un muscle <i>vastus lateralis</i> . Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).	80
Figure 47 : Représentation de la méthode de calcul de l'indice CapTor.	81
Figure 48 : Marquage en immunofluorescence d'une cellule satellite. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).....	160

REVUE DE LITTERATURE

I. LA DRÉPANOCYTOSE

I.1. Définition et épidémiologie

La drépanocytose, ou anémie falciforme, est une hémoglobinopathie génétique. D'après les rapports de l'OMS de 2006, on dénombre environ 5 millions de personnes atteintes de la drépanocytose dans le monde. La drépanocytose est une préoccupation de santé publique mondiale.

Elle est majoritairement retrouvée en zone endémique où sévit le paludisme. On la retrouve dans les pays et les populations d'origine d'Afrique subsaharienne, du pourtour du bassin méditerranéen, d'Inde, du Moyen-Orient, et des Antilles (Figure 1). C'est probablement la résistance qu'elle engendre vis à vis du paludisme qui explique cette répartition géographique (Nagel et Roth, 1989).

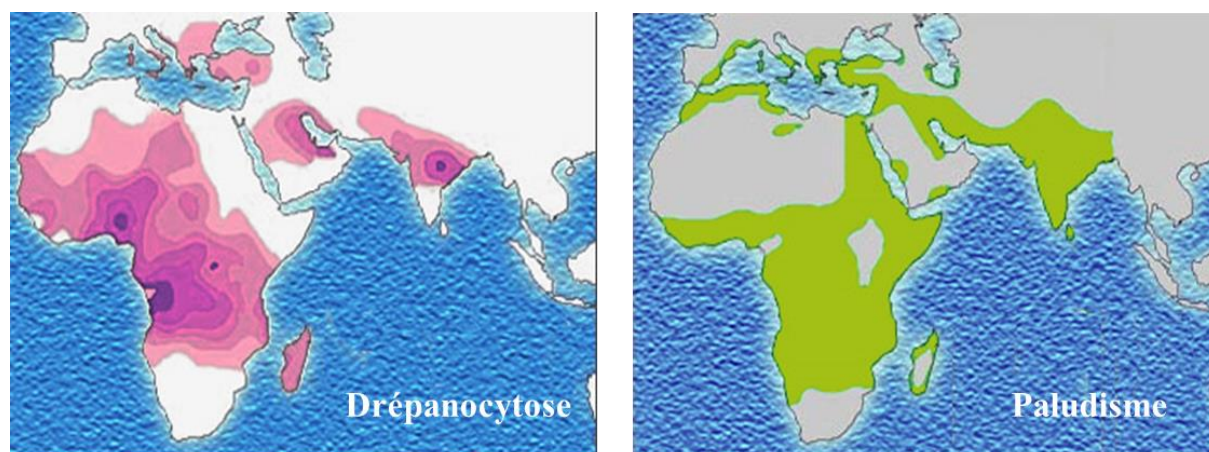


Figure 1 : Superposition des répartitions géographiques de l'allèle β^S et du *Plasmodium falciparum*.

Les flux migratoires importants des siècles passés font que cette hémoglobinopathie se retrouve désormais répandue aux Etats-Unis et en Europe de l'Ouest, dont la France. En effet, 7 à 9 % de la population afro-américaine est porteuse du trait drépanocytaire (NIH, 2002) et 100 000 américains sont homozygotes à la drépanocytose, soit 0,2% de la population afro-américaine (Ejindu *et al.*, 2007). En France, on recense environ 15 000 à 20 000 patients drépanocytaires. Pour la seule France métropolitaine, on observe plus de 300 naissances de sujets drépanocytaires par an et on retrouve le trait drépanocytaire sur environ 12 000 naissances par an (Galactéros, 1996). Sur la seule région Ile-de-France, la prévalence est de 0,2 % de la population générale, le nombre de sujets drépanocytaires est d'environ 3 000

(Galactéros, 2000, Bardakdjian, 2004) et une naissance sur 780 est un sujet drépanocytaire (d'après le Bulletin épidémiologique hebdomadaire de l'institut de veille sanitaire, 3 Juillet 2012).

Si cette hémoglobinopathie reste considérée comme une maladie rare, puisqu'elle concerne moins d'une personne sur 2 000 dans le monde (environ une naissance sur 3 500), la drépanocytose et le trait drépanocytaire sont tout de même très répandus dans certaines régions du globe. Dans certains pays, cette pathologie constitue une réelle préoccupation de santé publique. Ainsi, on retrouve 2 millions de drépanocytaires au Cameroun, population objet des études présentées dans ce manuscrit. De plus, 20 % de la population camerounaise est porteuse du trait drépanocytaire.

Le gène β^S est présent sous forme de cinq haplotypes localisés dans cinq régions mondiales distinctes désignées d'après leur épicode, chacun étant caractéristique d'une mutation particulière. Ainsi, les haplotypes Sénégal, Bénin, Cameroun et Bantou ont été décrits en Afrique, et l'haplotype Arabo-Indien à la fois en Arabie et en Inde (Figure 2).

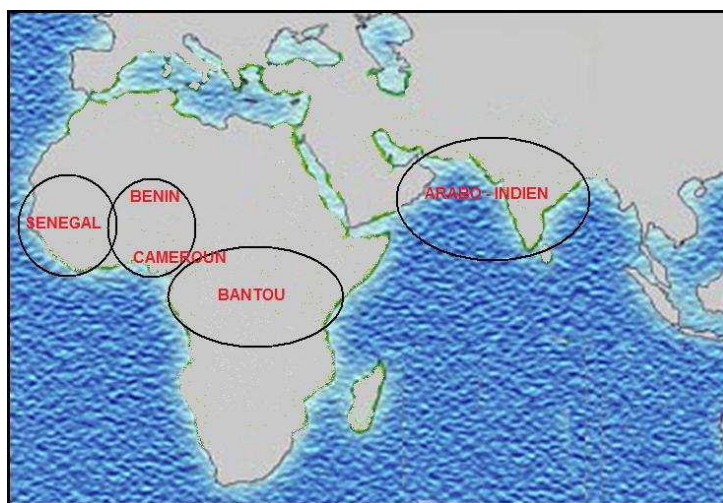


Figure 2 : Distribution géographique des haplotypes drépanocytaires.

I.2. Génétique et physiopathologie

I.2.a. Génétique

La drépanocytose a été largement étudiée par Pauling et collaborateurs (Pauling *et al.*, 1949) qui ont été les premiers à mettre en évidence une différence de migration électrophorétique de l'hémoglobine des hématies falciformes, caractéristiques de la maladie.

Cette migration est plus lente, moins anodique que l'hémoglobine A (HbA) normale (Figure 3). Les auteurs ont donc ainsi qualifié la drépanocytose de « maladie moléculaire ».

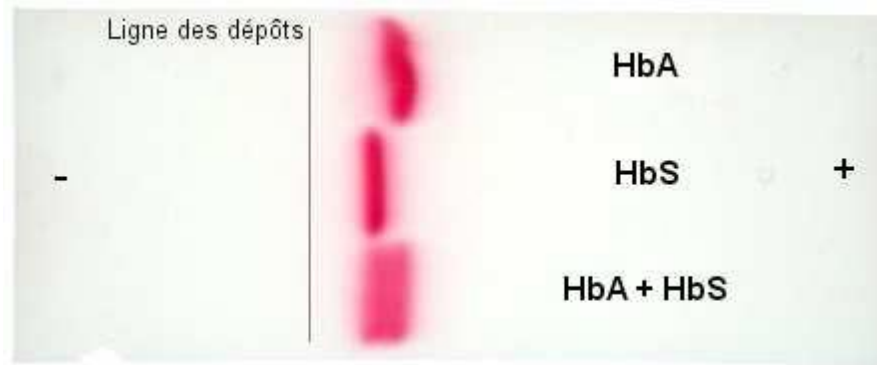


Figure 3 : Mise en évidence par électrophorèse de la migration d'HbA et d'HbS.

Ultérieurement, il a été montré que la drépanocytose est une maladie génétique causée par une mutation unique. Il s'agit d'une mutation ponctuelle d'au moins un des deux gènes codant pour la chaîne β -globine (Ingram, 1956, Galactéros, 2000). Une thymine se substitue à une adénine au niveau du sixième codon du gène β -globine du chromosome 11 (Ingram, 1956, Galactéros, 2000). Au niveau protéique, cela se traduit par la substitution de l'acide glutamique par une valine. Cette substitution entraîne la formation d'une hémoglobine anormale, appelée hémoglobine S (HbS), de l'anglais « *sickle* » (Figure 4).

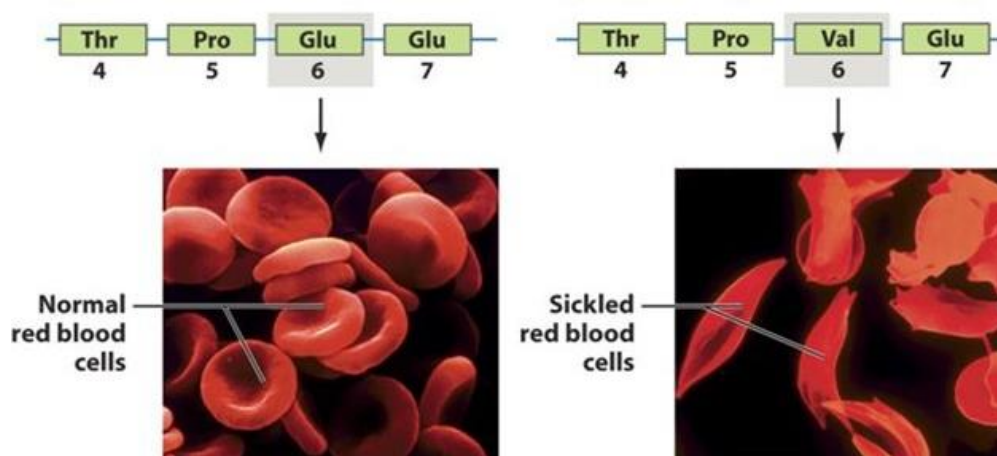


Figure 4 : Séquence d'acides aminés codant pour l'Hb normale (à gauche) et l'HbS (à droite). D'après (Griffiths *et al.*, 2000).

La drépanocytose se transmet selon un mode autosomique récessif de type mendélien (Figure 5). On distingue deux génotypes en rapport avec deux phénotypes cliniques distincts :

les sujets hétérozygotes, appelés « porteurs du trait drépanocytaire » (SCT de l'anglais « *sickle cell trait* », HbAS) et les sujets homozygotes pour la maladie, appelés sujets drépanocytaires (SCA de l'anglais « *sickle cell anemia* », HbSS). Les abréviations retenues pour les sujets sains « contrôles » sont CON et HbAA. Les sujets SCT, hétérozygotes, possèdent un gène codant pour la chaîne β -globine normale et un gène codant pour l'isoforme mutée (S), alors que les sujets drépanocytaires portent la mutation sur les deux gènes codant pour la chaîne β -globine. Les sujets porteurs du trait drépanocytaire présentent donc la particularité de synthétiser simultanément de l'hémoglobine A et de l'hémoglobine S, avec un taux d'hémoglobine S inférieur à 50 % de l'hémoglobine totale. En revanche, les sujets SCA ont un taux d'hémoglobine S systématiquement supérieur à 50 %, l'hémoglobine restante (hors HbA et HbS) étant principalement l'hémoglobine fœtale, HbF et de l'hémoglobine A2, habituellement présentes en quantité restreinte dans la population générale (<1 % et environ 2,5 %, respectivement).

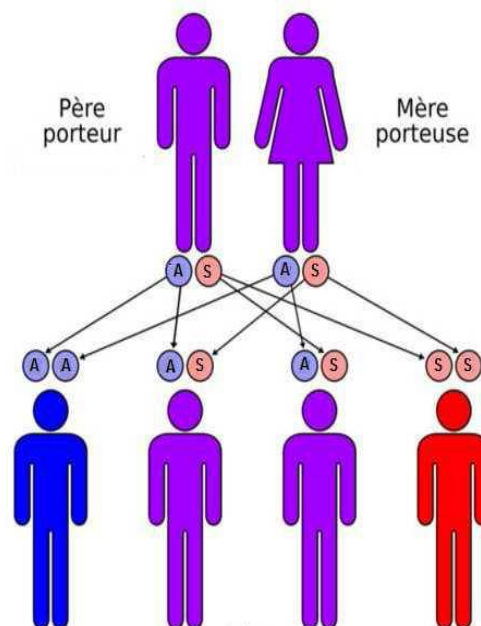


Figure 5 : Représentation du mode de transmission autosomique récessif du gène β^s à partir de deux parents hétérozygotes à la drépanocytose.

Le sujet bleu est un sujet sain, les sujets violets sont les sujets hétérozygotes et le sujet rouge est un sujet homozygote à la drépanocytose.

I.2.b. Polymérisation de l'hémoglobine S et falciformation des globules rouges

A l'origine, le globule rouge mature, présenté comme une cellule discoïde biconcave, est dépourvu de noyau et a une extrême souplesse. L'hématocrite, qui correspond au

pourcentage de globules rouges dans lesquels se trouve l'hémoglobine a des valeurs normales se situant entre 37 et 47 % chez la femme adulte et entre 40 et 52 % chez l'homme adulte. La déformabilité des globules rouges dépend principalement de trois facteurs : l'élasticité membranaire, le volume globulaire moyen et la viscosité interne de la cellule dont le type et la concentration d'hémoglobine sont des facteurs majeurs.

L'hémoglobine est formée de l'association de la globine et d'un hème. La globine est une protéine hétérotétramérique formée de quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux, ces sous-unités étant de type α , β , δ et γ , permettant de classer les différents types d'hémoglobine (Widmaier *et al.*, 2008). Chez un adulte sain, trois types d'hémoglobines sont présents en quantité plus ou moins importante (Tableau1). Les valeurs normales du taux d'hémoglobine se situent entre 12 et 16 g/dL chez la femme adulte et 14 et 18 g/dL chez l'homme adulte (Société canadienne du sang). Quant à la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), qui correspond à la quantité d'hémoglobine contenue dans 100 mL d'hématies, sa valeur normale est comprise entre 32 et 36 g/100 mL.

Types d'hémoglobines	Chaînes de globine	Proportion (%)
Hémoglobine A normale (HbA)	$\alpha_2\beta_2$	forme majoritaire
Hémoglobine A2 (HbA2)	$\alpha_2\delta_2$	2,5
Hémoglobine fœtale (HbF)	$\alpha_2\gamma_2$	traces (< 1 %)

Tableau 1 : Les différents types d'hémoglobines chez l'adulte sain. D'après (Bernard *et al.*, 1998).

L'hème est une protoporphyrine IX solidement fixée par des liaisons covalentes au cœur de chacune des chaînes de globine, et liant un atome de fer par liaisons de coordination. Cet atome de fer, dans l'état Fe^{2+} , possède la propriété de fixer l'oxygène de façon réversible : $Hb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2$, avec Hb = désoxyhémoglobine, et HbO_2 = oxyhémoglobine.

La mutation génétique du gène β^A normal en β^S anormal entraîne un changement de charge et de polarité de la molécule d'hémoglobine. Alors que l'acide glutamique est hydrophile et chargé négativement, la valine est hydrophobe et non chargée. La valine β_6 d'une molécule HbS, bien qu'hydrophobe mais entourée d'eau, établit des liaisons hydrophobes avec en particulier la phénylalanine β_{85} et la leucine β_{88} d'une molécule HbS adjacente (Vekilov, 2007). Ce gène muté, à l'origine de la production d'HbS, modifie la configuration de la molécule expliquant ainsi les particularités physico-chimiques de l'HbS : hyposolubilité, polymérisation en milieu désoxygéné et faible affinité pour l'oxygène. Cette

moindre solubilité de la désoxyhémoglobine S conduit à l'association d'HbS et à l'agrégation de polymères d'HbS ou filaments tactoïdes (Figure 6).

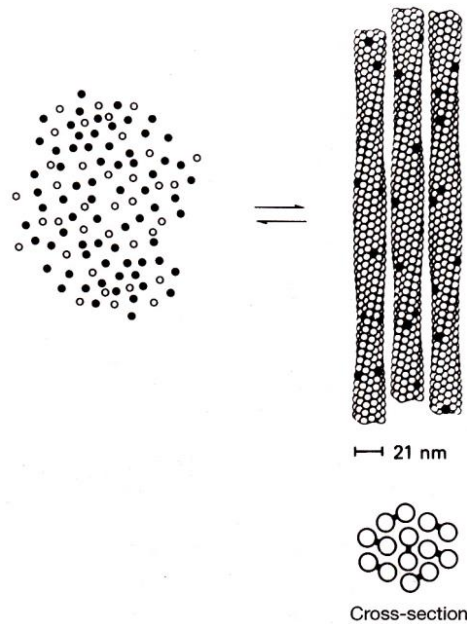


Figure 6 : Formation réversible d'un polymère d'HbS composé de 7 double brins hélicoïdaux d'hémoglobine S sous l'effet de la désoxygénation. D'après (Eaton et Hofrichter, 1987).

La particularité de cette hémoglobine S est que, à basse pression en oxygène et a fortiori dans sa forme désoxygénée, la protéine change de conformation par rapport à sa forme oxygénée, provoquant la polymérisation de la molécule. Cette polymérisation de l'HbS désoxygénée est à l'origine de la falciformation du globule rouge drépanocytaire (Figure 7). Sous l'effet de la désoxygénation, cette polymérisation à l'intérieur du globule rouge résulte du passage d'un état fluide à un état paracristallin de l'HbS. Le globule rouge change alors de conformation et se retrouve déformé et distendu par ces cristaux qui le traversent, induisant ainsi une diminution de sa plasticité et des lésions de sa membrane dont la perméabilité est modifiée. Il en résulte alors une perturbation des échanges ioniques transmembranaire (Palek et Lux, 1983).

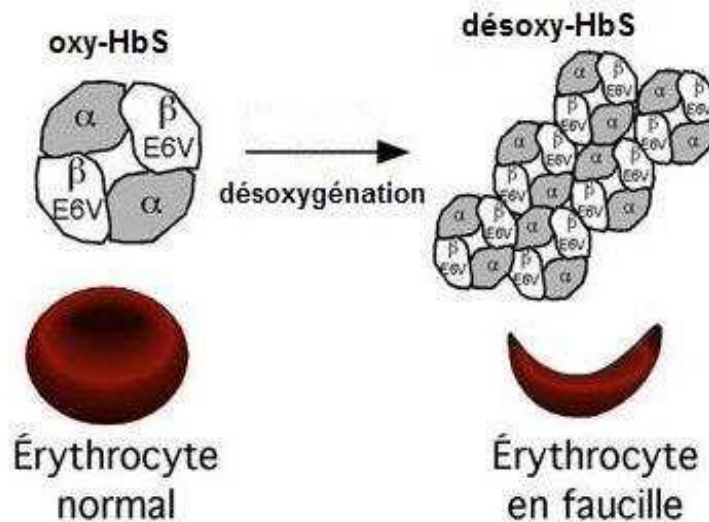


Figure 7 : Polymérisation de la désoxyhémoglobine S aboutissant à la falciformation du globule rouge.

Ce processus de polymérisation demande un certain temps à s'amorcer, de l'anglais « *delay time* » (Hofrichter *et al.*, 1974), qui est inversement proportionnel à la concentration intracellulaire en hémoglobine S. En effet, plus la concentration intracellulaire en HbS est élevée, plus ce temps de latence est court (Labie et Elion, 2005). Cet intervalle de latence est fonction de nombreux facteurs dont les plus communs sont l'élévation de la température (Hofrichter *et al.*, 1974), l'acidose (baisse du pH) (Ueda et Bookchin, 1984), l'hypoxie (Bessis et Delpéch, 1982) ou la déshydratation cellulaire (Ueda et Bookchin, 1984). Ce délai nécessaire pour l'initiation de la polymérisation est un facteur critique dans le phénomène de falciformation des globules rouges (Mozzarelli *et al.*, 1987).

Quand la polymérisation est prolongée, les érythrocytes prennent alors une forme de faucille, « *sickle cell* » en anglais. Il s'agit du processus de falciformation. C'est alors qu'on parle de drépanocyte (Figure 8). Ces drépanocytes irréversibles sont caractéristiques du sang veineux des homozygotes à la drépanocytose.

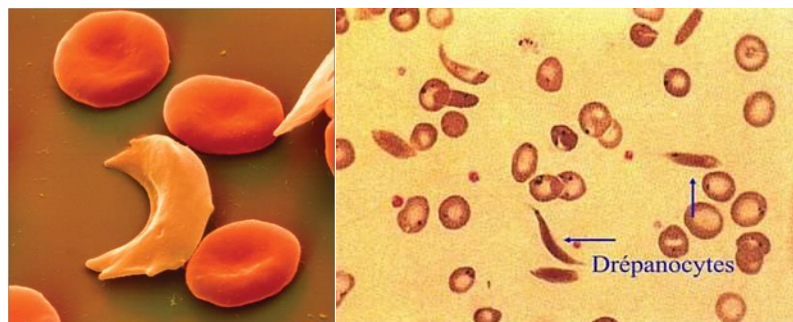


Figure 8 : Représentation de globules rouges falciformés, appelés drépanocytes.

Le processus de polymérisation de l'HbS génère des dommages au niveau du cytosquelette et de la membrane erythrocytaire, mais quand ces derniers sont limités aussi bien dans le temps d'installation que dans le nombre de molécules concernées, ce processus est réversible et le globule rouge peut reprendre sa forme initiale. Il s'agit alors de discocytes. Cependant, après plusieurs cycles de désoxygénation-réoxygénation, les dommages augmentent et le processus de polymérisation de l'HbS devient irréversible, donnant lieu à la formation d'hématies définitivement déformées. De plus, les dommages occasionnés sur le cytosquelette augmentent également la fragilité du globule rouge contenant de l'HbS (Barabino *et al.*, 2010), qui peut ainsi voir sa durée de vie dans la circulation sanguine diminuée jusqu'à seulement 15 jours (McCurdy et Sherman, 1978) contre environ 120 jours pour un globule rouge normal HbA (Shemin et Rittenberg, 1946, Callender *et al.*, 1947). Sous cette forme, les érythrocytes deviennent plus rigides. De plus, la polymérisation de l'hémoglobine anormale entraîne une diminution de déformation (propriété fondamentale permettant de circuler dans des vaisseaux capillaires de diamètre inférieur au sien), une rigidification et une fragilisation du globule rouge. L'enchaînement de ces anomalies est responsable de l'anémie hémolytique et des crises vaso-occlusives à l'origine de la majeure partie de la symptomatologie clinique spécifiquement rencontrée chez ces patients (Figure 9) et sur laquelle nous reviendrons ultérieurement (Labie et Elion, 2005).

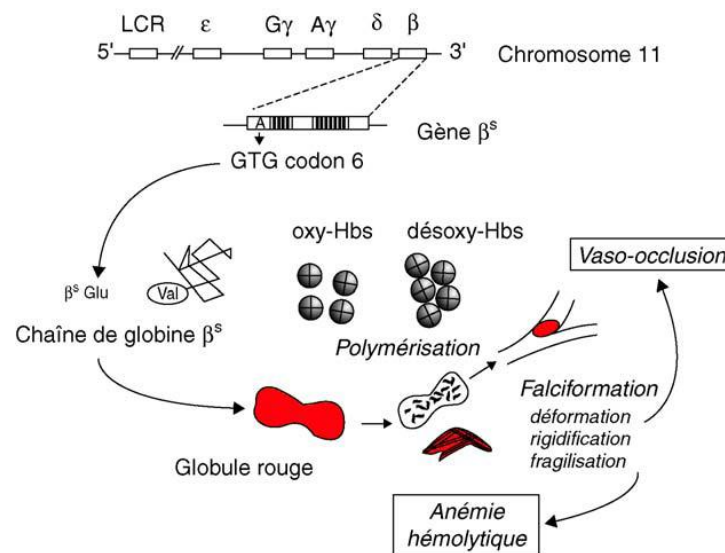


Figure 9 : Mécanisme physiopathologique de base de la drépanocytose. D'après (Labie et Elion, 2005).

Le phénomène de polymérisation conditionne également l'affinité de l'HbS pour l'oxygène (Bessis et Delpech, 1982). En situation normale, l'hémoglobine normale se lie avec

l'oxygène via un procédé allostérique, où l'affinité de l'hémoglobine avec l'oxygène est affectée par la saturation en oxygène de la molécule, donnant ainsi une forme sigmoïde à la courbe d'affinité de l'oxygène pour l'hémoglobine. En présence d'HbS, dans des conditions physiologiques basales, et tant que la concentration en HbS reste inférieure au seuil correspondant au début de polymérisation de l'hémoglobine, soit environ 15 g/dL à 37°C, l'affinité de l'hémoglobine S pour l'oxygène est comparable à celle de l'hémoglobine A (Benesch *et al.*, 1978). En revanche, au-delà de ce seuil, la diminution du pouvoir oxyphorique de l'HbS est caractérisée par l'augmentation de la P_{50} (pression partielle en O_2 nécessaire pour saturer à 50% en oxygène l'hémoglobine), avec un déplacement caractéristique de la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine (CDO) vers la droite (P_{50} de 35 mmHg chez les SCA *versus* 27 mmHg chez les CON) (Elbaum et Nagel, 1981, Lonsdorfer *et al.*, 1990), ce qui favorise la dissociation de l'oxygène du sang (Figure 10). On peut observer ce déplacement vers la droite de la CDO suite à une augmentation de la température, de la concentration en ions H^+ , donc une acidose (effet Bohr), phénomènes qui sont impliqués dans la polymérisation de l'HbS. Ce décalage vers la droite de la CDO étant dépendant de la concentration en HbS (Bessis et Delpech, 1982), les sujets porteurs du trait drépanocytaire sont relativement « protégés » par l'hémoglobine A, et possèdent donc la même P_{50} que les sujets contrôles (Becklake *et al.*, 1955, Lonsdorfer *et al.*, 1990, Young *et al.*, 2000).

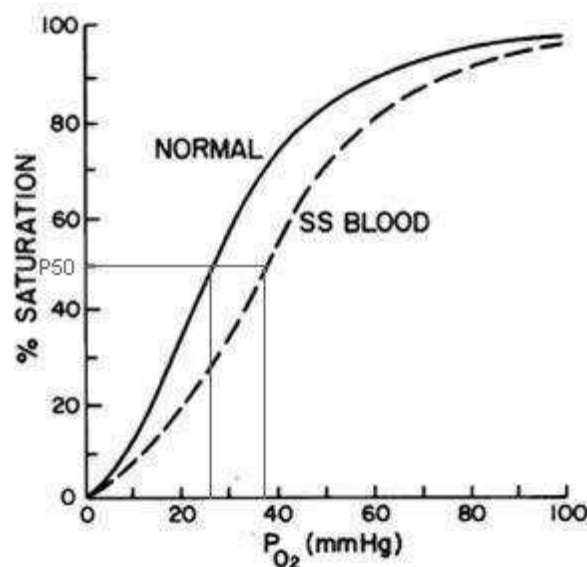


Figure 10 : Courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine décalée vers la droite chez les sujets drépanocytaires. D'après (Berger et King, 1980).

Cette augmentation de la P_{50} permet une meilleure libération de l'oxygène au niveau des tissus périphériques mais en revanche augmente la proportion d'HbS polymérisée et/ou polymérisable.

En revanche, la polymérisation est inhibée par l'oxygénation et la présence de certaines hémoglobines non-S, telles que l'hémoglobine normale HbA (Adachi et Asakura, 1984) ou l'hémoglobine fœtale HbF (Steinberg et Embury, 1986). L'HbF en particulier, présente une forte affinité pour l'oxygène et compense en partie les complications liées à l'HbS pendant les premiers mois de vie (May et Huehns, 1975).

I.2.c. Conséquences liées au taux d'hémoglobine fœtale (HbF)

Chez l'homme, l'érythropoïèse débute dans la lignée primitive érythroblastique du sac vitellin dès la fin de la troisième semaine du développement embryonnaire. Dès lors, trois hémoglobines embryonnaires sont successivement synthétisées. Les chaînes ζ et ε se combinent pour former l'hémoglobine Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), les chaînes α et ε s'associent pour former l'hémoglobine Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$) et les chaînes ζ et γ se regroupent pour former l'hémoglobine Portland ($\zeta_2\gamma_2$). Puis dès la cinquième semaine de gestation, les hémoglobines embryonnaires sont progressivement remplacées par l'hémoglobine fœtale ($\alpha_2\gamma_2$), qui devient le constituant hémoglobinique prédominant à partir de la dixième semaine du développement embryonnaire et ce, jusqu'à la naissance. L'hémoglobine fœtale atteint entre la 8^{ème} et la 10^{ème} semaine un taux de 90% qui reste ensuite à peu près constant jusqu'à la naissance. Peu avant la naissance, entre la 32^{ème} et la 36^{ème} semaine de développement embryonnaire, les chaînes γ sont progressivement remplacées par les chaînes polypeptidiques de globine adulte (Figure 11).

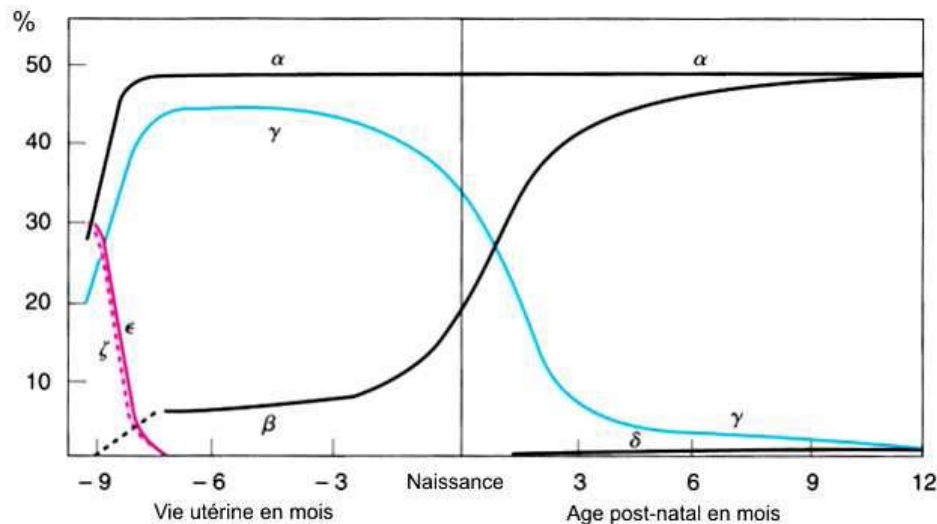


Figure 11 : Evolution des différentes chaînes d'hémoglobine synthétisées. D'après (Bernard *et al.*, 1998).

Ainsi, les premiers signes phénotypiques de la drépanocytose ne se manifestent pas avant la substitution des gènes γ par le gène β^S . C'est pour cette raison que les sujets drépanocytaires présentant une persistance de l'hémoglobine fœtale ont une sévérité clinique atténuée. En effet, dès les années 1960, Jackson et collaborateurs (Jackson *et al.*, 1961) ont observé que certains sujets drépanocytaires n'étaient pas pour autant anémiques et ne souffraient pas de crises drépanocytaires sévères. Ces patients homozygotes pour l'hémoglobine S présentaient un taux d'hémoglobine fœtale exceptionnellement élevé. L'augmentation d'HbF entraîne donc une diminution concomitante d'HbS polymérisable due à la balance de l'expression entre les gènes fœtaux et adultes. De plus, comme l'hémoglobine fœtale a une meilleure affinité pour l'oxygène, la CDO de l'HbF est décalée vers la gauche avec une P_{50} aux alentours de 19 (Figure 12).

Enfin, il a également été mis en évidence une relation entre l'haplotype et le taux d'HbF. En effet, chez les porteurs des haplotypes Sénégal et Indien, un taux d'HbF plus élevé a été observé. En revanche, l'existence d'une relation entre ces haplotypes et une moindre fréquence des principales complications de la maladie reste controversée (Powars *et al.*, 1990, Rieder *et al.*, 1991, de Montalembert *et al.*, 1993, Neonato *et al.*, 2000).

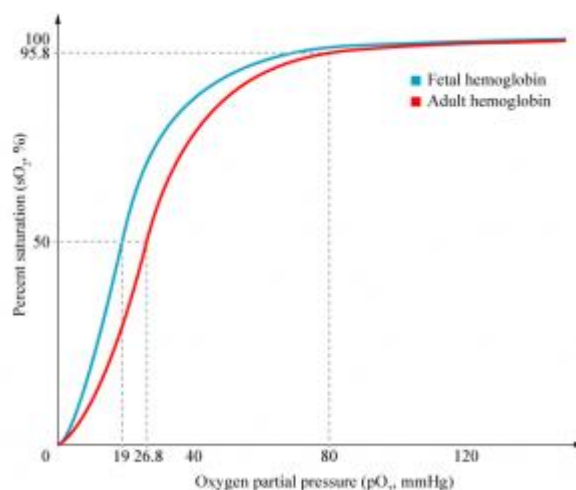


Figure 12 : Courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine fœtale décalée vers la gauche.

I.3. Présentation « clinique »

I.3.a. Sujets SCA

Chez les sujets drépanocytaires, deux types de manifestations cliniques majeures de la maladie sont observés : une anémie chronique hémolytique et des crises vaso-occlusives qui apparaissent dès les premiers mois de vie, quand l'hémoglobine drépanocytaire remplace progressivement l'hémoglobine fœtale.

Tout d'abord, vu que les hématies falciformes sont fragilisées et se rompent facilement, elles sont séquestrées et détruites par le filtre splénique. Même stimulée par la nécrose des cellules, l'érythropoïèse ne peut suivre le rythme de l'hémolyse et ne peut donc pas compenser la perte d'érythrocytes. Ainsi, on observe chez les sujets drépanocytaires une anémie hémolytique qui limite l'apport en oxygène aux tissus. En d'autres termes, la polymérisation de l'HbS est responsable de cette anémie (Rees *et al.*, 2010).

De plus, les crises vaso-occlusives sont les manifestations cliniques les plus fréquentes mais également les plus sévères chez l'adulte (Habibi, 2004) car elles relèvent de l'obstruction des microvaisseaux par les hématies falciformes rigidifiées suite à la polymérisation de l'HbS. Ces dernières peuvent interrompre complètement l'apport sanguin à un organe et être à l'origine d'une nécrose tissulaire par anoxie. Selon le tissu en question, cela peut se manifester par des douleurs intenses et brutales, atteignant fréquemment les extrémités des membres (mains et pieds), « hand-foot » syndrome (Ejindu *et al.*, 2007) mais également les hanches et l'abdomen (Ahmed *et al.*, 2005). Parallèlement à ce phénotype « vaso-occlusif », la drépanocytose s'accompagne, entre autres, de troubles

hémorhéologiques, d'un stress oxydant sanguin, d'une moindre biodisponibilité du NO et à une forte augmentation de l'adhérence des globules rouges à l'endothélium. Tous ces désordres conduisent également à un phénotype « vasculopathe » du drépanocytaire.

Ejindu et collaborateurs (Ejindu *et al.*, 2007) se sont plus particulièrement intéressés aux manifestations ischémiques aiguës itératives sur le tissu osseux de sujets drépanocytaires. Ils ont remarqué que cette complication courante dans la maladie pouvait entraîner des effets à long terme sur la croissance et la qualité de l'os. Ainsi d'importants retards staturo-pondéraux sont fréquemment observés chez les enfants, ainsi que des déformations du faciès et du crâne (Giroto, 1994). L'observation de radiographies peut parfois également révéler une ostéopénie chez l'adulte (Ejindu *et al.*, 2007). Sur différentes localisations de l'os, des thrombii par accumulation d'érythrocytes ont également été décrits. Des infarctus sont ainsi observés dans les cavités médullaires et dans les épiphyses osseuses, donnant lieu à des crises douloureuses. Dans les cas les plus sévères, cela peut conduire à la destruction de l'os, la nécrose ischémique de l'épiphyse étant commune chez le sujet SCA, surtout au niveau des têtes du fémur et de l'humérus. Des surinfections de l'os et des articulations (ostéomyélites, périostites, arthrites) sont également des complications sévères de la drépanocytose. Ainsi il existe un processus physiopathologique au niveau de l'os du drépanocytaire bien décrit et en rapport direct avec les épisodes d'ischémie aiguë. Il est raisonnablement envisageable qu'un phénomène analogue se produise au niveau du tissu musculaire et qu'il soit à l'origine de mécanismes de remodelages.

Dès le plus jeune âge, les sujets drépanocytaires sont exposés aux complications de la drépanocytose. Il a notamment été avancé que l'anémie chronique pourrait engendrer un risque supplémentaire d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) chez les sujets SCA. En effet, les accidents vasculaires cérébraux sont plus particulièrement observés chez les enfants, et concernent 10% des sujets drépanocytaires (Habibi, 2004). Il a ainsi été suggéré que l'augmentation du flux sanguin cérébral associée à l'anémie chronique pouvait conduire à des problèmes vasculaires cérébraux (Ohene-Frempong *et al.*, 1998). Cependant, l'étude directe des vaisseaux dans le cerveau des sujets SCA est très difficile, et peu de données sont accessibles.

Chez les sujets drépanocytaires, une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) peut être associée à l'hémolyse (Gladwin *et al.*, 2004b). L'hypertension artérielle pulmonaire du sujet SCA est la complication chronique la mieux reconnue à l'heure actuelle (Maitre *et al.*, 2011). On la retrouve chez 32 % d'entre eux (Kato *et al.*, 2006). Il est également suggéré que l'HTAP soit un facteur de risque supplémentaire de mort soudaine (Gladwin *et al.*, 2004b).

De plus, Pegelow et collaborateurs (1997) ont clairement montré que la survie après un accident vasculaire cérébrale était moins élevée chez les SCA ayant de l'hypertension artérielle pulmonaire (Pegelow *et al.*, 1997).

Par ailleurs, les infections sont également plus nombreuses chez les jeunes sujets drépanocytaires que chez les sujets sains du même âge. Elles sont responsables d'une part importante de la mortalité par co-morbidité de la drépanocytose (Leikin *et al.*, 1989, Rees *et al.*, 2010), telles que des méningites et des septicémies qui mettent en jeu le pronostic vital de ces patients (Bachir, 2000). Chez le jeune enfant, la séquestration des globules rouges falciformes dans la rate aboutit à une asplénie, favorisant les infections, qui sont la deuxième cause de mortalité précoce (Bachir, 2000). Par ailleurs, des infections associées à des embolies de graisse et des accès de vaso-occlusions de l'arbre vasculaire pulmonaire sont souvent la cause du syndrome thoracique aigu, fréquemment rencontré chez les drépanocytaires (Rees *et al.*, 2010).

Enfin, les données issues de questionnaires d'activité physique, montrent que les sujets SCA sont plus sédentaires que la population générale. Cette restriction d'activité contribue certainement au déconditionnement cardio-respiratoire et à l'intolérance à l'effort (Adebayo *et al.*, 2002, Callahan *et al.*, 2002, Machado *et al.*, 2007). Cela peut influencer négativement le contrôle de la masse musculaire chez ces sujets. Cette potentielle amyotrophie est suspectée au regard d'un retard staturo-pondéral fréquent (Ashcroft *et al.*, 1972, Ejindu *et al.*, 2007), et de l'index de masse corporelle plus faible chez ces sujets (Ravelojaona *et al.*, Article 1). De fait, l'attitude à adopter vis à vis de l'activité physique chez les sujets HbSS est discutée mais à ce jour ne repose sur aucun consensus.

I.3.b. Sujets SCT

Le sujet porteur du trait drépanocytaire est classiquement considéré comme « asymptotique » (Diggs, 1933). La présence de symptômes et leurs sévérités semblent relativement proportionnelles à la concentration intraglobulaire en hémoglobine anormale (Lonsdorfer *et al.*, 1990), celle-ci étant inférieure à 50% de l'hémoglobine totale. La présence de l'HbA empêche la polymérisation de l'HbS pour une saturation en oxygène inférieure à 60%. Ainsi, le temps de latence de polymérisation de l'HbS est prolongé (Noguchi, 1984). Cependant, certains auteurs ont montré qu'en présence de certains stress (fièvre/hyperthermie, hypoxie, activité physique intense), la survenue du processus de polymérisation de l'HbS et la falciformation des érythrocytes sont possibles et même favorisées (Bookchin *et al.*, 1976, Martin *et al.*, 1989, Bergeron *et al.*, 2004). Bien que considérés comme « asymptotiques »,

les sujets SCT courent donc un risque médical lié à la présence d'hémoglobine S circulante, spécialement lorsqu'ils font face à une situation physiologique stressante comme lors d'un séjour en altitude ou lors d'un exercice physique intense (Jones *et al.*, 1970, Kark *et al.*, 1987, Harrelson *et al.*, 1995, Bergeron *et al.*, 2004, Anzalone *et al.*, 2010). Dans ce contexte, l'étude post-mortem réalisée sur des recrues militaires noires américaines en période de formation par Kark et collaborateurs (1987), a rapporté un risque relatif de 30 % de mort subite inexplicée. De plus, en cas d'exercice épuisant, ce risque est multiplié par 30 chez les recrues militaires SCT par rapport aux recrues noires américaines saines et par 40 par rapport à l'ensemble des recrues. Les auteurs ont ainsi remarqué que, au cours de la pratique sportive, le risque relatif de mort subite des sujets SCT serait plus élevé que chez les sujets sains (Kark *et al.*, 1987). En ce sens, Harrelson et collaborateurs (1995) ont montré que les sujets porteurs du trait drépanocytaire sont susceptibles de présenter des accès rhabdomyolytiques sévères qui peuvent conduire jusqu'à leur mort (Harrelson *et al.*, 1995). En effet, l'exercice intense s'accompagne d'une hypoxémie locale relative, d'une acidose métabolique, d'une déshydratation et d'une augmentation de la température corporelle. Ce sont autant de facteurs, qui, réunis, favorisent la survenue du processus de polymérisation de l'hémoglobine S puis de falciformation des hématies (Bergeron *et al.*, 2004), réduisant l'apport d'oxygène aux tissus certes, mais surtout conduisant à des épisodes vaso-occlusifs généralisés, potentiellement très sévère.

I.4. Circulation vasculaire et HbS

I.4.a. Le globule rouge drépanocytaire

Nous avons vu précédemment que la mutation génétique β^S , suite à l'enchaînement des cycles de polymérisation/dépolymérisation induisait une altération du globule rouge et de ses propriétés. Ces globules rouges falciformes étant plus rigides, moins déformables et plus fragiles conduisent à des altérations hématologiques et hémorhéologiques chez les patients drépanocytaires. Cette déformation de l'érythrocyte entraîne la libération de vésicules et une déshydratation cellulaire, ainsi qu'une augmentation de la perméabilité de la membrane aux cations (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+}). De plus, un micro-environnement oxydant apparaît, avec formation de Fe^{3+} , création d'un cycle d'auto-oxydation de l'HbS et retentissement sur les autres protéines du globule rouge (Hebbel *et al.*, 1990). Cela aboutit à un remaniement des phospholipides et à l'expression de molécules d'adhésion au niveau membranaire. Ainsi, les interactions des globules rouges avec leurs environnements plasmatiques et cellulaires sont

modifiées, notamment vis-à-vis de la cellule endothéliale. De ce fait, l'observation du globule rouge drépanocytaire a permis d'expliquer les crises vaso-occlusives, où les érythrocytes moins déformables obstruent les vaisseaux sanguins de petits et moyens diamètres (Baudon, 2009) (Figure 13).

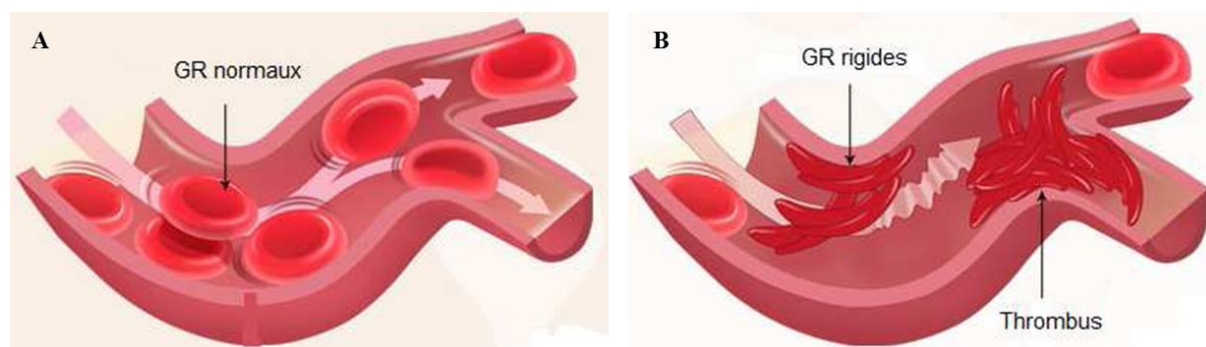


Figure 13 : Microcirculation des globules rouges.

A : Microcirculation avec des GR normaux ; B : Microcirculation avec des GR moins déformables obstruant les microvaisseaux et créant une vaso-occlusion. Copyright © National Heart, Lung and Blood Institute.

Cependant, les globules rouges falciformes ne peuvent expliquer à eux-seuls la survenue des crises vaso-occlusives. En effet, ce schéma physiopathologique ne prend pas en compte les facteurs susceptibles d'augmenter le temps de transit des globules rouges dans les territoires désoxygénés que représentent les plus petits microvaisseaux (Kaul et Nagel, 1993).

I.4.b. L'adhésion vasculaire

Il a été montré qu'il y avait un processus d'adhérence anormale des hématies falciformées aux cellules de l'endothélium vasculaire (Hoover *et al.*, 1979, Hebbel *et al.*, 1980a, Hebbel *et al.*, 1980b, Hebbel *et al.*, 1980c) suggérant des altérations rhéologiques chez les patients atteints de la drépanocytose. De plus, l'enchaînement des cycles de falciformation/défalciformation des globules rouges modifie leur potentiel adhésif en augmentant l'expression de certains récepteurs des molécules d'adhésion (Chiang et Frenette, 2005). Par ailleurs, les sujets drépanocytaires ont un environnement vasculaire pro-inflammatoire propice à l'adhérence des hématies falciformes et des leucocytes (Kaul *et al.*, 2006). Les leucocytes des patients atteints de la drépanocytose ont également un potentiel adhésif plus important que ceux des sujets sains (Kaul et Hebbel, 2000). L'adhésion à l'endothélium se fait *via* l'expression des protéines pro-adhésives spécifiques telles que VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), ICAM-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1), P-sélectine et E-sélectine (Hebbel, 1997, Manwani et Frenette, 2013). Il y a

donc un enchaînement d'évènements chez les drépanocytaires qui conduit aux crises vaso-occlusives :

- 1) les phénomènes d'adhésion vasculaire ralentissent le flux sanguin et permettent la falciformation des érythrocytes,
- 2) les hématies falciformées obstruent les microvaisseaux, et
- 3) ces obstructions vasculaires créent une hypoxémie locale, ce qui favorise la polymérisation de l'HbS.

Le facteur déclenchant une crise vaso-occlusive est donc souvent difficile à identifier. Cependant, lors des crises vaso-occlusives, on observe fréquemment chez les drépanocytaires une surexpression des molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1, P-sélectine et E-sélectine) par les cellules endothéliales (Hebbel, 1997, Solovey *et al.*, 1997). Cette adhésion importante proviendrait donc de multiples activations cellulaires (Kaul et Nagel, 1993).

I.4.c. L'altération du tonus vasculaire

Il a été montré l'existence d'une altération du tonus vasculaire dans la drépanocytose, en conséquence d'une diminution de production de monoxyde d'azote (NO) et d'une augmentation de l'endothéline-1 (ET-1) (Labie et Elion, 2005, Kato *et al.*, 2007).

Le NO, gaz soluble, est un radical très réactif, qui induit la relaxation musculaire des vaisseaux en inhibant l'entrée du calcium dans les cellules musculaires lisses (Gladwin et Schechter, 2001). Il est formé à partir de l'arginine par des NO synthétases (NOS) et en particulier au niveau des cellules endothéliales. Dans la drépanocytose, le NO a plusieurs effets bénéfiques dont l'inhibition de l'adhésion des globules rouges contenant de l'HbS, avec l'endothélium vasculaire et l'inhibition de la déshydratation des globules rouges. Cependant, les sujets drépanocytaires présentent un déficit en NO explicable en trois points : 1) par défaut de production (déficit du précurseur physiologique de NO : L-arginine) (Morris *et al.*, 2000, Vichinsky, 2002, Morris *et al.*, 2005, Kato *et al.*, 2007), 2) par oxydation prématurée du NO induite par l'hémoglobine plasmatique qui provient d'une hémolyse importante (Reiter *et al.*, 2002), et/ou 3) par l'anion superoxyde formé par la xanthine oxydase (XO) dont le taux plasmatique est élevé chez les patients drépanocytaires (Aslan *et al.*, 2001). Ainsi la diminution de la production de NO et sa moindre biodisponibilité, réduisant son activité chez les patients atteints de la drépanocytose, participent très probablement à la physiopathologie des crises vaso-occlusives (Giroto *et al.*, 2003). Par ailleurs, les perturbations hémorhéologiques telles que la déformabilité des globules rouges et l'adhérence élevée induisent la production de radicaux libres et de ce fait inactivent la production de NO

(Turchetti *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter que l'hydroxyurée, utilisée comme traitement thérapeutique de la drépanocytose en stimulant l'expression de l'HbF, est également un donneur de NO (Gladwin *et al.*, 2002, Girot *et al.*, 2003).

En revanche, l'ET-1 est le plus puissant vasoconstricteur connu, contribuant ainsi à l'augmentation du tonus vasculaire (Girot *et al.*, 2003). Les drépanocytes peuvent induire la transcription du gène ET-1 *in vitro* (Phelan *et al.*, 1995), ce qui pourrait expliquer l'augmentation de son taux circulant dans la drépanocytose (Rybicki et Benjamin, 1998).

Il existe donc un déséquilibre du tonus vasculaire, avec une altération de la balance NO/ET-1 en faveur d'une moindre vasomotricité vasculaire, contribuant aux phénomènes vaso-occlusifs.

I.4.d. Hyperplasie vasculaire de l'*intima* : occlusion vasculaire

L'hyperplasie intimale seule ou associée à un événement thrombogène est reconnue comme un mécanisme déterminant dans les occlusions vasculaires fréquemment observées chez les sujets drépanocytaires (Francis et Johnson, 1991). Cette hyperplasie vasculaire, caractérisée histologiquement par une prolifération de fibroblastes et de cellules musculaires lisses, pourrait être l'expression de la réponse vasculaire secondaire à l'agression chimique, mécanique ou cellulaire de la cellule endothéliale (Francis et Johnson, 1991). L'épaississement de l'*intima* (paroi la plus interne principalement composée de cellules épithéliales et de tissu conjonctif lâche, cf partie II.3.a) conduit à des sténoses segmentaires qui sont à la fois sources d'occlusions vasculaires, pouvant être associées à un processus de thrombose et à la fois responsables du ralentissement du flux sanguin. Ce phénomène a été largement décrit au niveau des artères cérébrales (Rothman *et al.*, 1986) où il rappelle les processus observés dans la maladie de Moyamoya. L'origine et le déroulement de l'occlusion vasculaire artérielle sont complexes à déterminer car il existe de nombreux facteurs cellulaires et hormonaux impliqués. Cette hyperplasie intimale a également été mis en évidence dans d'autres territoires vasculaires tels qu'au niveau splénique et pulmonaire et également dans les artéioles de la rétine où l'occlusion vasculaire est considérée comme étant à l'origine de la rétinopathie drépanocytaire et d'une raréfaction des capillaires par nécrose (Asdourian *et al.*, 1976). Cependant, la littérature reste pauvre au sujet de ce phénomène au niveau de la microcirculation du muscle strié squelettique.

I.5. Différence hommes/femmes dans la drépanocytose

Très peu d'études ont rapporté un éventuel effet genre chez les patients drépanocytaires. A première vue, les signes cliniques de la drépanocytose n'apparaissent pas différents entre les hommes et les femmes SCA : on retrouve les mêmes dans les deux sexes. Ainsi, on pourrait s'attendre à des répercussions musculaires similaires chez les hommes et les femmes drépanocytaires, et à un moindre degré chez les hommes et les femmes SCT.

Cependant, certains éléments pourraient induire une différence. Parmi ceux-ci, il a été montré que les femmes drépanocytaires ont un taux d'HbF plus élevé que les hommes drépanocytaires (Nagel et Ranney, 1990, Steinberg *et al.*, 1995, Nath *et al.*, 2004). Ce taux plus élevé pourrait être en partie expliqué par le fait que la synthèse d'HbF est partiellement contrôlée par un gène situé en position *Xp22.2* du chromosome X (Dover *et al.*, 1992). Or comme cela a été dit précédemment, la présence d'hémoglobine fœtale diminue la proportion d'HbS, ce qui réduit le risque de polymérisation (Akinsheye *et al.*, 2011, Steinberg *et al.*, 2014). Il a été clairement montré que le taux d'hémoglobine F module la sévérité de la maladie. En effet, les sujets drépanocytaires ayant un taux d'HbF plus élevé ont des crises douloureuses moins sévères et moins fréquentes, moins d'ulcères de jambes, une ostéonécrose moins marquée, des syndromes thoraciques aigus moins fréquents et une meilleure espérance de vie (Platt *et al.*, 1991, Platt *et al.*, 1994, Steinberg *et al.*, 1995, Akinsheye *et al.*, 2011). De plus, l'administration d'hydroxyurée (HU), qui permet d'augmenter le taux d'HbF, est un traitement fréquemment utilisé et réduit les symptômes, la morbidité et la mortalité des sujets drépanocytaires (Platt *et al.*, 1994, Ballas et Mohandas, 2004, Nath *et al.*, 2004, Gladwin et Sachdev, 2012, Steinberg *et al.*, 2014). En supposant que les femmes drépanocytaires sont davantage susceptibles de bénéficier de cet effet protecteur de l'HbF, on pourrait alors s'attendre à des répercussions cliniques et tissulaires moins sévères que chez les hommes SCA. Cependant, le taux d'HbF n'étant pas systématiquement retrouvé augmenté chez toutes les femmes, ce prédéterminisme génétique semblerait également modulé par des facteurs ethniques (Steinberg *et al.*, 1995, Steinberg *et al.*, 2014).

A cela il faut aussi ajouter, l'effet genre connu sur la concentration en hémoglobine total. Que ce soit sur une population saine ou drépanocytaires (Jandl, 1987, West *et al.*, 1992, Steinberg *et al.*, 1995) les femmes présentent un taux plus bas et sont volontiers plus anémiques que les hommes. Or il a été montré dans deux études que les sujets drépanocytaires qui ont une anémie plus sévère ont moins de crises douloureuses par rapport aux sujets SCA hommes ou femmes moins anémiques (Baum *et al.*, 1987, Lande *et al.*, 1988). De plus, Platt et collaborateurs ont observé chez les sujets drépanocytaires qu'un taux d'hématocrite plus

élevé était corrélé à une sévérité des crises douloureuses plus importante (Platt *et al.*, 1991). En effet, les sujets drépanocytaires ayant une anémie sévère ont une moindre viscosité sanguine, ce qui pourrait réduire la sévérité et la fréquence des crises vaso-occlusives. De ce fait, les femmes drépanocytaires étant souvent plus anémiques que les hommes drépanocytaires pourraient avoir de moindres répercussions, notamment au niveau microvasculaire. Cependant, si l'anémie est vraiment trop sévère ($Hb \leq 7,1$ g/dL), un risque de mortalité plus élevé est encouru par rapport aux autres patients (Platt *et al.*, 1994).

Un effet genre a également été identifié concernant le monoxyde d'azote (NO) dans la drépanocytose. En effet, la biodisponibilité du NO ne semble pas altérée chez les femmes SCA alors qu'elle l'est chez les hommes SCA, où on retrouve une diminution à la fois de la biodisponibilité du NO ainsi que de la réponse au NO exogène (Gladwin *et al.*, 2003). Conjointement, la présence de la molécule d'adhésion VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) est élevée dans le plasma des drépanocytaires, et est inversement corrélée à la disponibilité et la production de NO endogène. Ainsi, on retrouve un taux de sVCAM-1 plus élevé chez les hommes que les femmes drépanocytaires (Gladwin *et al.*, 2003). Ainsi, le NO joue un rôle majeur dans l'homéostasie vasculaire du sujet drépanocytaire en régulant la vasomotricité, limitant l'agrégation des plaquettes et l'ischémie-reperfusion, et en modulant la prolifération endothéliale (Figure 14). C'est pourquoi, ces différences homme/femme observées au niveau du métabolisme du NO et de l'expression de la molécule d'adhésion VCAM-1 pourraient éventuellement apporter une base physiopathologique d'un effet genre sur la morbidité et la mortalité dans la drépanocytose. Il faut également noter que le NO est également lié au contrôle de la transcription de l'HbF, ce qui suggère qu'une différence de sa biodisponibilité peut également induire une expression variable d'HbF entre les hommes et les femmes (Ikuta *et al.*, 2001, Gladwin *et al.*, 2003).

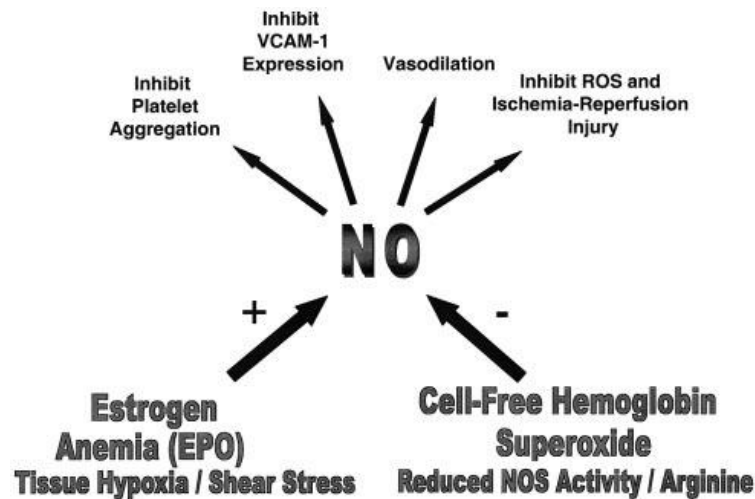


Figure 14 : Rôle majeur du NO dans la drépanocytose. D'après (Gladwin *et al.*, 2003).

Par ailleurs, il a également été montré que l'hormone sexuelle, œstrogène, engendre un effet protecteur indirect sur la fonction endothéliale. En effet, dans l'artériosclérose, autre exemple de maladie vasculaire caractérisée par une inflammation chronique et de l'ischémie-reperfusion (Gladwin *et al.*, 2003), les œstrogènes induisent une augmentation de l'expression du NO synthase (NOs) et donc de la production basale endothéliale de NO (Hayashi *et al.*, 1992, Weiner *et al.*, 1994, Guetta *et al.*, 1997, Koh *et al.*, 1999). Cette meilleure biodisponibilité du NO permettrait ainsi de limiter la dysfonction endothéliale liée à la maladie vasculaire. Il ne serait donc pas surprenant de retrouver un remodelage du réseau microvasculaire différent entre les hommes et les femmes drépanocytaires.

II. EXPLORATION DU MUSCLE STRIÉ SQUELETTIQUE

II.1. Organisation structurale du muscle

Le muscle strié squelettique est un composant essentiel pour notre organisme, permettant la production du mouvement grâce au caractère contractile des myocytes qui sont regroupés en faisceaux, plusieurs faisceaux formant un muscle. Le muscle entier est engainé d'une capsule conjonctive appelée épimysium (encore appelée aponévrose musculaire), et les faisceaux sont quant à eux enveloppés du péri-mysium. Enfin, chaque myocyte est entouré par l'endomysium, gaine de soutien collagénique, qui constitue la partie la plus externe de leur matrice extra-cellulaire (Figure 15) (Jones, 2005).

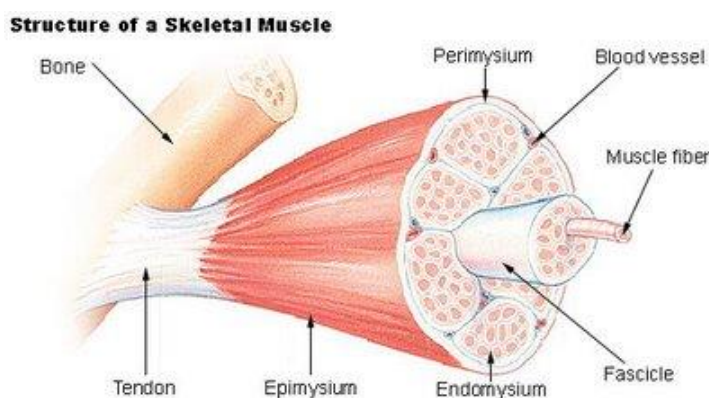


Figure 15 : Organisation tissulaire du muscle strié squelettique.

Ces myocytes sont classifiés selon leurs différentes propriétés histochimiques. De ce fait, il existe des différences considérables en fonction des propriétés contractiles. Ainsi, on peut distinguer des spécificités essentielles selon le contenu protéique, enzymatique, le nombre de mitochondries, l'organisation de la vascularisation, de l'innervation... (Jones, 2005).

Le muscle strié squelettique est un tissu unique, composé de fibres qui sont des cellules multinucléées. En effet, on estime à environ 200 à 300 le nombre de noyaux par millimètre de longueur de fibre musculaire (Jones, 2005). Ces myonuclei sont retrouvés à la périphérie de la fibre, sous la membrane plasmique. D'autres noyaux se situant à l'extérieur de la membrane plasmique mais sous la lame basale de la fibre musculaire correspondent aux noyaux des cellules satellites. Les cellules satellites, ainsi situées sont mononucléées (Figure

16) (Mauro, 1961). Ces cellules contribuent à la croissance musculaire et la réparation des fibres endommagées (Jones, 2005).

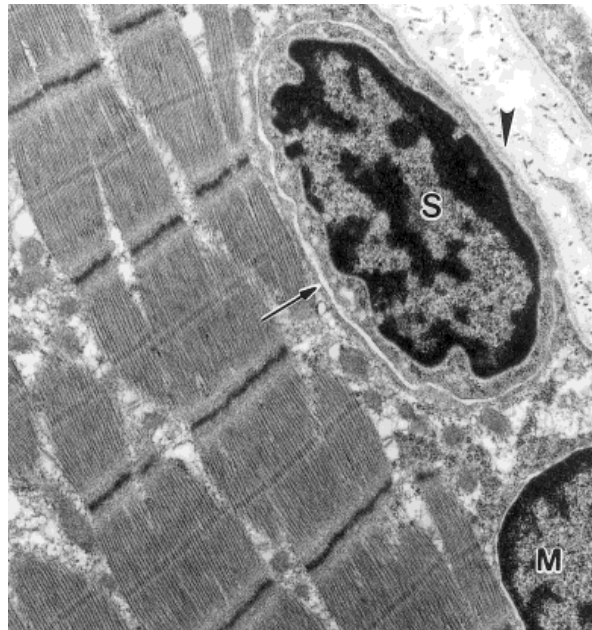


Figure 16 : Position d'une cellule satellite (S) dans le muscle strié squelettique par rapport à un myonuclei (M). D'après (Roth *et al.*, 2000).

II.1.a. Différents types de fibres musculaires

Le muscle est un appareil contractile, qui dispose de systèmes de fourniture d'énergie variés et d'une importante vascularisation avec notamment un réseau capillaire très développé. Suivant la typologie de l'unité motrice (lente, intermédiaire ou rapide), ce ne sont pas les mêmes chaînes lourdes de myosine (MHC pour myosin heavy chain) qui sont exprimées dans les myocytes. Chez l'homme, le profil contractile peut-être caractérisé par 3 types de MHC. Trois gènes codent pour ces trois isoformes différentes : MHC I qui est trouvée dans les fibres lentes, MHC IIa caractéristique des fibres intermédiaires et MHC IIx des fibres rapides. Lors du métabolisme énergétique, de nombreuses enzymes interviennent pour produire des molécules d'ATP (Adénosine TriPhosphate). La prépondérance des différentes voies métaboliques et les isoformes enzymatiques qui les composent varient également selon la fonction du muscle, s'il est oxydatif, glycolytique ou mixte (ex : H-LDH et M-LDH respectivement oxydative et glycolytique). Ainsi, les fibres musculaires sont hautement hétérogènes, en fonction des protéines et des organites (Tableau 2) qu'elles contiennent et de leur environnement cellulaire immédiat. Par exemple, les fibres lentes de type I contiennent beaucoup de myoglobine, d'enzymes oxydatives et de mitochondries et

sont richement vascularisées, ce qui leur permet d'assurer une contraction lente et prolongée mais développent peu de force. Ces fibres ont de ce fait une résistance à la fatigue élevée. En revanche, les fibres rapides de type IIx sont pauvres en myoglobine, en enzymes oxydatives et en mitochondries. Elles ont un métabolisme glycolytique prépondérant ce qui permet d'assurer une contraction rapide et puissante. Cependant ces fibres sont rapidement fatigables.

	Type I	Type IIa	Type IIx
Couleur (myoglobine)	Rouge (élevée)	Rose (intermédiaire)	Blanche (faible)
Vascularisation	Importante	Intermédiaire	Faible
Source ATP	Oxydation	Mixte	Glycolyse
Enzymes anaérobies	+	++	+++
Enzymes aérobie	+++	++	+
Activité mitochondriale	+++	++	+
Calibre des myocytes	+	++	+++
Nombre de myocytes par unité motrice	+	++	+++
Propriétés contractiles	Faible et longue	Intermédiaire	Forte et brève
Résistance à la fatigue	+++	++	+

Tableau 2 : Caractéristiques des 3 principaux types de fibres.

II.1.b Régénération et dégénérescence musculaire

Le muscle strié squelettique est connu pour sa plasticité. En effet, sa structure et sa fonction peuvent être modifiées sous l'influence de divers stimuli tels que l'entraînement (Zumstein *et al.*, 1983, Staron *et al.*, 1990, Hudlicka *et al.*, 1992, Messonnier *et al.*, 2001, Hoppeler et Fluck, 2003), la stimulation électrique chronique (Pette et Vrbova, 1992), une dénervation (Adhihetty *et al.*, 2007), la microgravité (Fitts *et al.*, 2001), l'hypoxie (Howald *et al.*, 1990, Hoppeler et Vogt, 2001, Olfert *et al.*, 2001) et également certaines pathologies induisant ces différents phénomènes. C'est le cas de la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) imposant une hypoxie tissulaire chronique chez le patient concerné (Whittom *et al.*, 1998, Gosker *et al.*, 2003, de Theije *et al.*, 2011). Le muscle a une capacité à s'adapter en réponse à ces stimuli, ce qui peut le conduire à un remodelage de son intimité

structurale. Ces mêmes causes peuvent également se traduire par des signes de dégénérescence (fibrose, nécrose, signes inflammatoires) et/ou de régénération (centralisation nucléaire, segmentation des fibres) du tissu musculaire, conséquences observables à partir de préparations immunohistochimiques (Dubowitz, 2007).

Les cellules satellites représentent un outil de régénération primordial du muscle strié squelettique. Ce sont des cellules myogéniques quiescentes en attente d'un signal cellulaire ou tissulaire (contraintes mécaniques, zone lésée, nécrose...) pour intervenir (Figure 17).

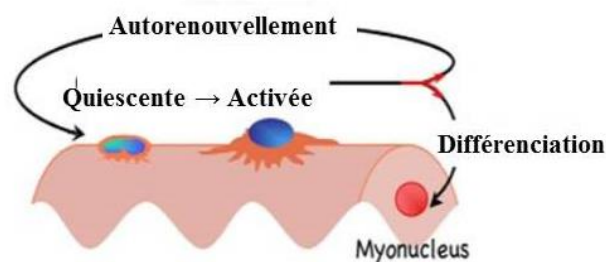


Figure 17 : Cycle de vie des cellules satellites.

Ainsi, pendant la régénération musculaire, sous l'action de différents stimuli, les cellules satellites sortent de leur état quiescent, s'activent et prolifèrent pour générer des précurseurs ou myoblastes. Ceux-ci pourront, soit fusionner entre eux et générer de nouveaux myotubes qui donneront de nouvelles fibres musculaires, soit incorporer un segment de fibre préexistante.

II.2. Potentiel énergétique musculaire

II.2.a. L'adénosine triphosphate (ATP)

Le corps humain doit tirer de son environnement d'importantes quantités d'énergie et de matière, nécessaires dans le but d'entretenir ses tissus et ses organes, indispensables également dans ses activités fonctionnelles. Le muscle squelettique est un organe majeur produisant et consommant de l'énergie, permettant la contraction musculaire grâce à l'adénosine triphosphate (ATP). En effet, l'énergie mécanique nécessaire à la contraction musculaire provient directement de l'ATP (énergie chimique). L'ATP est composée d'une molécule organique, l'adénosine, elle-même constituée d'un sucre ribose et d'une base azotée

adénine, et est attachée à trois groupes phosphate (Figure 18) dénommés alpha (α), bêta (β) et gamma (γ) phosphates.

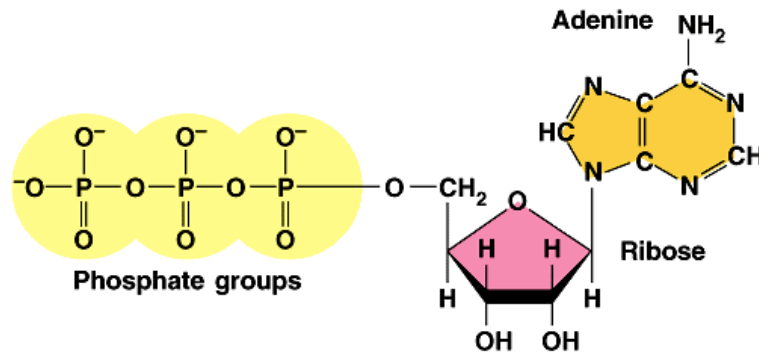
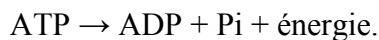


Figure 18 : Structure chimique de l'ATP. D'après (Campbell et Reece, 2005).

Les liaisons entre les groupes phosphates sont très énergétiques. Quand trois phosphates sont présents en série, comme c'est le cas dans l'ATP, une liaison phosphate peut se rompre par hydrolyse, libérant ainsi un ion phosphate inorganique (Pi) et une grande quantité d'énergie (30,5 kJ.mol⁻¹) (Campbell et Reece, 2005). La réaction associée est la suivante :



L'ATP devient alors adénosine diphosphate (ADP) (Figure 19).

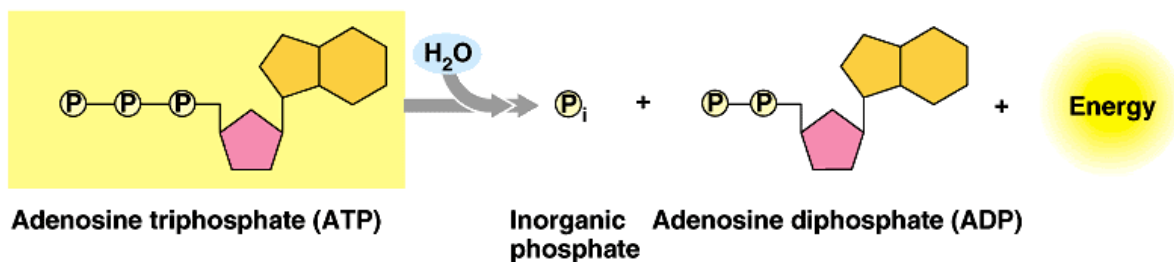


Figure 19 : Hydrolyse de l'ATP. D'après (Campbell et Reece, 2005).

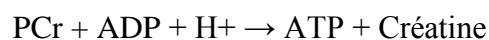
Cette réaction est exergonique et produit en condition standard 7,3 kcal d'énergie par mole d'ATP hydrolysée.

Les muscles squelettiques utilisent et produisent continuellement de l'ATP, et les réserves cellulaires sont très réduites (5 mmol.kg⁻¹ de muscle frais) (Hirvonen *et al.*, 1987). L'ATP est une ressource renouvelable qui peut être constamment régénérée dans la cellule par l'addition d'un phosphate à l'ADP. Il existe plusieurs voies métaboliques pour

resynthétiser l'ATP, et l'intervention préférentielle de l'une par rapport à une autre dépend de l'intensité, de la rapidité et de la durée de l'exercice. Le taux de renouvellement de l'ATP varie selon les voies et est inversement proportionnel à la quantité totale d'énergie disponible. Lors d'un exercice physique, principalement trois voies énergétiques interviennent en fonction de la durée et de l'intensité de l'exercice : anaérobie alactique, anaérobie lactique et aérobie. Les deux premières se font sans utilisation d'oxygène, alors que la filière aérobie repose sur l'oxydation des substrats.

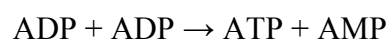
II.2.b. Les phosphagènes

Les phosphagènes, présents dans le muscle plus que dans n'importe quel autre tissu, sont des composés phosphorés qui libèrent une molécule d'acide phosphorique lors de son hydrolyse. Ils constituent l'ensemble des réserves de l'organisme qui sont sous forme de composés phosphorés, tels que l'ATP, l'ADP et la phosphocréatine (PCr). On les retrouve dans la voie anaérobie alactique. Cette voie utilise l'hydrolyse de l'ATP mais aussi celle de la PCr en réserve dans le tissu musculaire. Les énergies libres de l'hydrolyse de la PCr et de l'ATP étant similaires, le sens de la réaction est donc très sensible aux changements de concentration des réactifs :



Cette réaction est catalysée par la créatine kinase (CK), enzyme qui synthétise un ATP en transférant directement l'énergie libérée et le phosphate inorganique (Pi) sur l'ADP pour les convertir en ATP. La phosphocréatine joue donc un rôle de réservoir d'énergie supplémentaire. Cependant, avec seulement 5 mmol.kg^{-1} de muscle frais, cette réserve est très limitée. Cette réaction est réversible, de sorte que quand le muscle est riche en ATP, l'énergie est récupérée pour synthétiser de la PCr. Lorsque l'ATP redevient nécessaire, l'énergie mise en réserve est restituée.

Une autre voie permet de former rapidement de petites quantités d'ATP, il s'agit de la réaction catalysée par l'adénylate kinase :



Ce procédé survient surtout quand les réserves de PCr sont très restreintes ou épuisées, et la reconstitution en ATP est très coûteuse.

Avec la CK et l'adénylate kinase, le muscle possède donc des voies métaboliques fournissant rapidement une grande quantité d'énergie. Malheureusement, avec des réserves musculaires en ATP et PCr très faibles, ces voies métaboliques ne sont que de très court terme. C'est pourquoi ces voies métaboliques sont privilégiées lors d'exercices très courts et

intenses, tel qu'un départ de sprint par exemple. Ces voies métaboliques ne demandent pas d'oxygène et ne produisent pas de lactate : elles constituent la filière anaérobie alactique,

II.2.c. Métabolisme des hydrates de carbone

1. Glycogénolyse

La glycogénolyse (Figure 20) intervient dans le cytosol de la cellule musculaire. Bien que moins immédiate que la voie des phosphagènes, la mise en route de cette voie demeure extrêmement rapide, s'affranchissant de l'oxygène pour fonctionner.

La glycogénolyse est un procédé permettant la production de glucose-1-phosphate à partir de la phosphorylation du glycogène par l'enzyme phosphorylase kinase, elle-même régulée par une autre kinase dont l'activité est régulée par l'AMP cyclique. La phosphorylase kinase peut également être activée par le calcium intracellulaire (dans le muscle actif), signal de la contraction musculaire. De ce fait, la fragmentation du glycogène et la concentration musculaire sont coordonnées.

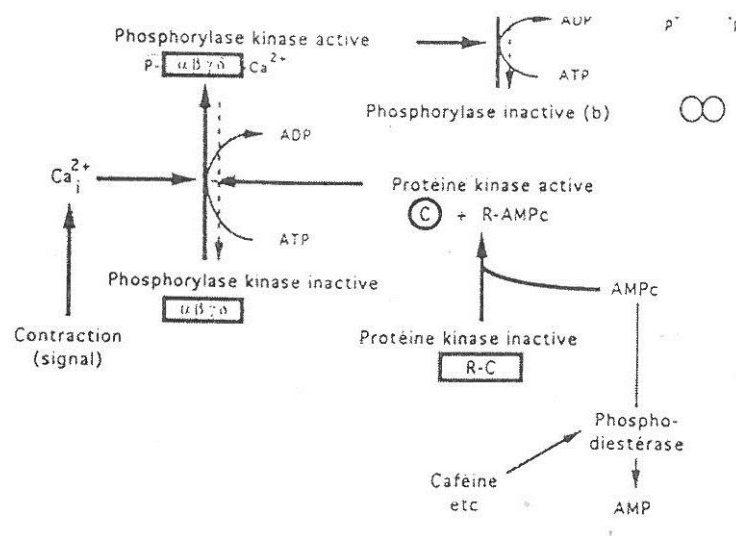


Figure 20 : Schéma de la glycogénolyse. D'après (Lehninger, 1979).

La transformation de glucose-1-phosphate en molécules de glucose-6-phosphate initie la glycolyse.

2. Glycolyse

La glycolyse (Figure 21) catabolise les hydrates de carbone, et essentiellement le glucose et le glucose 1-phosphate provenant du glycogène. Le procédé est complexe et comporte dix étapes, convertissant une molécule de glucose à 6 atomes de carbone en deux molécules de pyruvate (3 atomes de carbone). Ces réactions produisent un gain net de 2 molécules d'ATP et 4 atomes d'hydrogène dont 2 sont transférés au NAD^+ et 2 relargués dans le cytoplasme en ions H^+ :



Certaines réactions de la glycolyse sont allostériques, comme la catalyse du fructose 6-phosphate en fructose 1-6 disphosphate par l'enzyme phosphofructokinase (PFK). Cette étape demande beaucoup d'énergie et constitue une étape régulatrice importante de la glycolyse. Etant donné que la PFK est inactive en présence de marqueurs de charges énergétiques tels que l'ATP, le NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide), le FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et l'acide citrique, cette réaction est inhibée en cas d'excès d'énergie.

La partie finale de l'apport d'énergie par la glycolyse dépend beaucoup de la réaction de déshydrogénation, où les électrons sont retirés du glyceraldéhyde 3-phosphate et acceptés par le coenzyme nicotinamide-adénine dinucléotide (NAD) pour former ensuite le NADH.

La quantité de NAD étant limitée, ce dernier peut être régénéré par oxydation du NADH dans la chaîne respiratoire mitochondriale, nécessitant de l'oxygène pour fonctionner, l'oxygène étant l'accepteur final des atomes d'hydrogène (*vide infra*).

Cependant, si les oxydations mitochondriales sont insuffisantes, l'acide pyruvique s'accumule. La cellule musculaire dispose alors d'une autre voie pour régénérer le NAD, en réduisant l'acide pyruvique en acide lactique, réaction catalysée par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH). Au cours de cette réaction, l'acide pyruvique accepte 2 atomes d'hydrogène du $\text{NADH} + \text{H}^+$, devenant ainsi de l'acide lactique et régénérant le NAD nécessaire à la poursuite de la glycolyse. Cette seconde voie ne nécessite pas la présence d'oxygène mais aboutit à la production d'acide lactique, elle constitue la filière anaérobie lactique.

Vu que sa constante d'acidité ($\text{pK}_a = 3,9$) est très éloignée des valeurs physiologiques de pH, l'acide lactique produit se présente sous forme d'ions lactate et H^+ (Mainwood et Renaud, 1985), donnant naissance au concept d'acidose lactique.

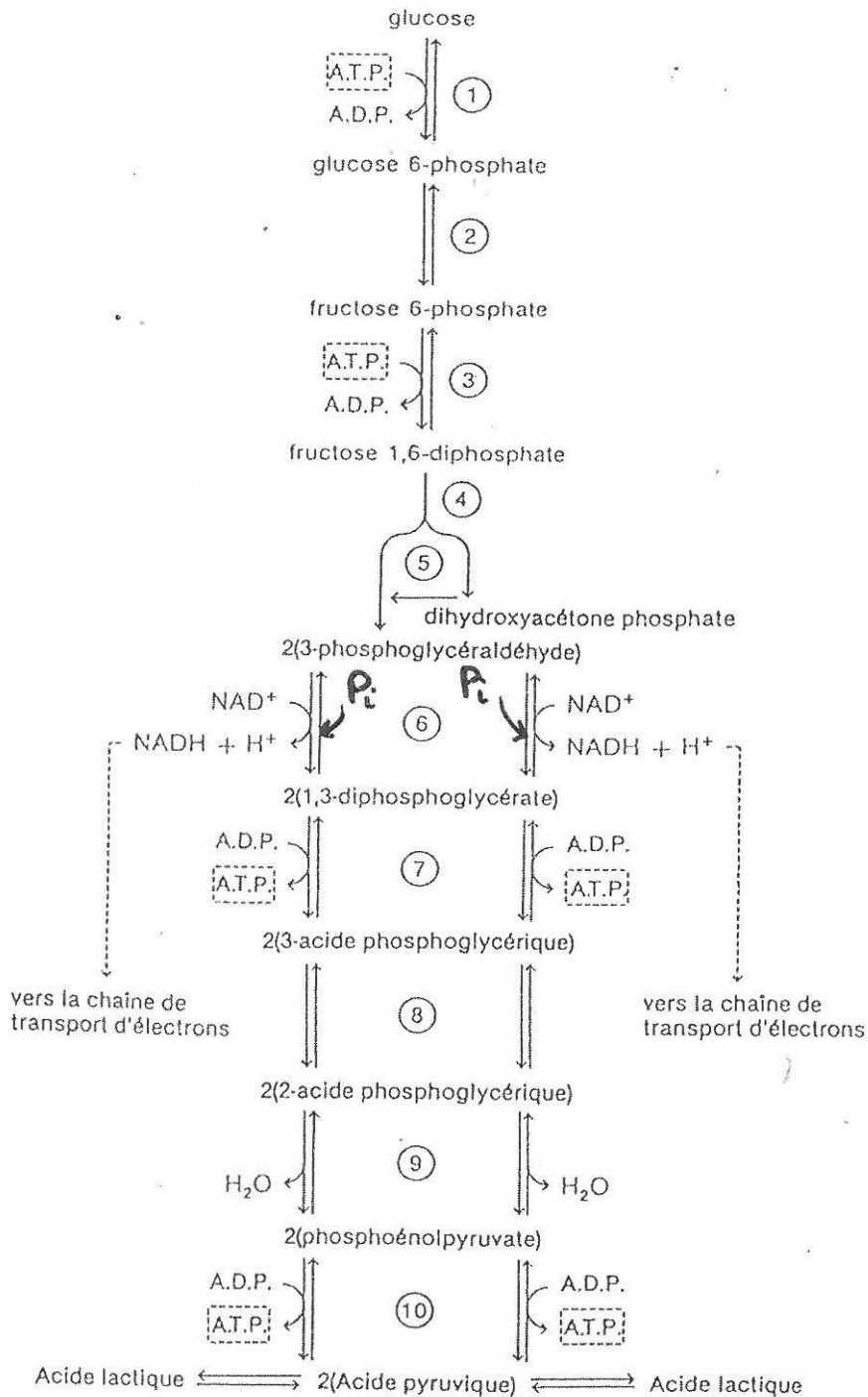


Figure 21 : Schéma de la glycolyse. D'après (Lehninger, 1979).

3. Cycle de Krebs

La glycolyse génère une quantité non négligeable d'énergie mais aussi deux molécules d'acide pyruvique. Alors que la glycolyse se déroule dans le cytoplasme de la cellule, la suite du métabolisme du pyruvate a lieu à l'intérieur de la mitochondrie en présence d'oxygène. Le

pyruvate est tout d'abord décarboxylé et lié au coenzyme A (CoA) pour former l'acétyl-CoA, avant d'entrer dans le cycle de Krebs (Figure 22).

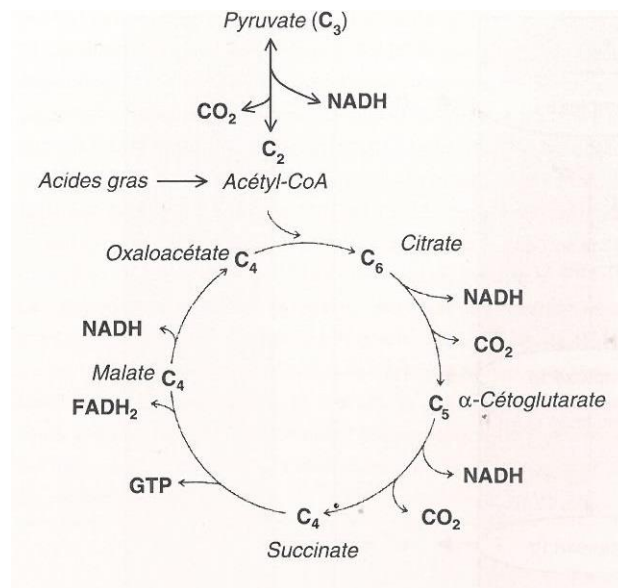


Figure 22 : Schéma du cycle de Krebs. D'après (Jones, 2005).

La première étape de ce cycle est la formation de l'acide citrique (ou citrate) grâce à la citrate synthase (CS), permettant la condensation de l'acétyl-CoA avec l'acide oxaloacétique. Le reste du cycle consiste en une série de réactions de déshydratation et de décarboxylation pour finalement revenir à son point de départ, l'oxaloacétate, qui pourra réagir à nouveau avec l'acétyl-CoA et ainsi recommencer le cycle. Les hydrogènes pris en charge par les coenzymes NAD et FAD au cours des différentes réactions sont ensuite traités par oxydation dans la chaîne respiratoire mitochondriale.

4. Phosphorylation oxydative

La chaîne de transport des électrons correspond à une association de complexes enzymatiques et de cytochromes présents au sein de la membrane interne de la mitochondrie. Elle est responsable de la phosphorylation oxydative par la contribution de l'ATP synthétase (ATPase) (Figure 23).

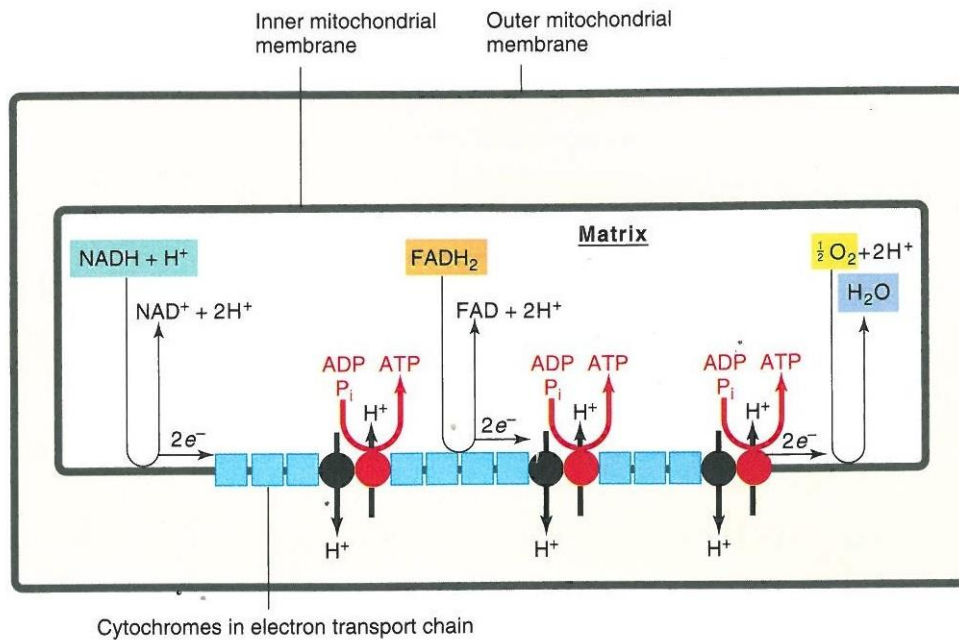


Figure 23 : Cytochromes dans la chaîne respiratoire mitochondriale. D'après (Widmaier *et al.*, 2008).

L'énergie transférée à l'ATP provient de l'énergie libérée quand les ions H^+ s'associent avec l'oxygène pour former de l'eau. L'hydrogène provient de l'oxydation du $NADH + H^+$ et du $FADH_2$, coenzymes réduits principalement lors du cycle de Krebs, de la glycolyse (*vide supra*) et de la B-oxydation (*vide infra*). Les électrons qui proviennent du $NADH + H^+$ et du $FADH_2$ vont perdre de l'énergie qui sera par la suite utilisée pour former le gradient électrochimique de protons entre l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale. Un gradient de protons est ainsi créé et les électrons riches en énergie sont récupérés et transportés depuis l'intérieur de la mitochondrie en trois endroits via les différents complexes, les cytochromes, dont le complexe IV, cytochrome *c* oxydase (COx). Ces complexes protéiques permettent aux ions hydrogènes de retourner à la matrice mitochondriale favorisant ainsi le transfert d'énergie aboutissant à la formation d'ATP à partir de l'ADP et du P_i . La présence d'oxygène est essentielle car le flux d'électrons au travers de la chaîne respiratoire ne peut se poursuivre que si l'oxygène est l'accepteur final d'électron. L'oxygène participe ainsi à la formation d'eau.

Le métabolisme oxydatif est un processus complexe et la production d'ATP qu'il engendre est relativement lente. Cependant, il s'agit d'une utilisation efficace des réserves d'énergie puisque la dégradation complète d'une molécule de glucose produit 38 molécules d'ATP. Le rendement énergétique de cette voie aérobie est donc très élevé.

La formation d'ATP par phosphorylation oxydative implique le transfert d'électrons et d'hydrogènes vers des molécules d'oxygène. Bien que les électrons transférés le long de la chaîne respiratoire mitochondriale servent à la formation d'eau, une partie d'entre eux s'échappe de la chaîne respiratoire et réagissent avec l'oxygène pour former des dérivés d'oxygènes transitoires tels que le peroxyde d'hydrogène et des radicaux libres, tels que l'anion superoxyde (H_2O_2) et des radicaux hydroxyles (OH^+). Ces dernières molécules sont très réactives. Elles s'associent à différents types de molécules pour former des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species). Les ROS peuvent réagir avec et détériorer les protéines, la membrane des phospholipides et les acides nucléiques. Ces dégâts peuvent être impliqués dans des réactions inflammatoires lors de lésions tissulaires conduisant à un endommagement des structures cellulaires. Cela donne lieu à un stress oxydant, défini comme une perturbation de la balance pro/anti-oxydant en faveur du premier (Sies et Cadenas, 1985, Powers et Jackson, 2008).

II.2.d. Métabolisme des lipides

Les lipides sont essentiellement sous forme de triglycérides dans les cellules adipeuses mais aussi mis en réserve sous forme de gouttelettes lipidiques dans les cellules musculaires. Lors de la contraction musculaire, les triglycérides musculaires mais aussi ceux du tissu adipeux, sont mobilisés pour fournir de l'énergie. Les molécules de triglycérides sont d'abord dégradés en glycérol et 3 acides gras par une lipase hormono-sensible (HSL).

Le glycérol pourra soit rejoindre la glycolyse au niveau du 3 phosphoglyceraldéhyde, soit être réutilisé par le foie pour former du glucose (néoglucogenèse hépatique), soit être ré-estérifié (formation de novo d'une molécule de triglycéride).

Les acides gras libres (AGL) circulants ou issus de la dégradation des triglycérides (TG) permettent également d'obtenir de l'énergie (ATP) dans la mitochondrie. La dégradation des acides gras est initiée par la liaison avec une molécule de coenzyme A au dernier groupe carboxyle qui va ensuite suivre une série de réactions connues sous le terme de β -oxydation (Figure 24). La β -oxydation aboutit à la production d'équivalents réducteurs pouvant alimenter la chaîne respiratoire ($FADH + H^+$ et $NADH + H^+$) et à la production d'acétyl-CoA qui pourra rentrer dans le cycle de Krebs permettant de fournir de l'énergie. En effet, chaque cycle de β -oxydation libère une molécule d'acétyl-CoA à partir de la dégradation des acides gras et comporte les 4 mêmes étapes successives dont la déshydrogénation de la β -hydroxyacyl-CoA, troisième étape de la β -oxydation. Cette réaction qui conduit au β -

cétoacyl-CoA est catalysée par la β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (β -HAD), une oxydoréductase ($\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$).

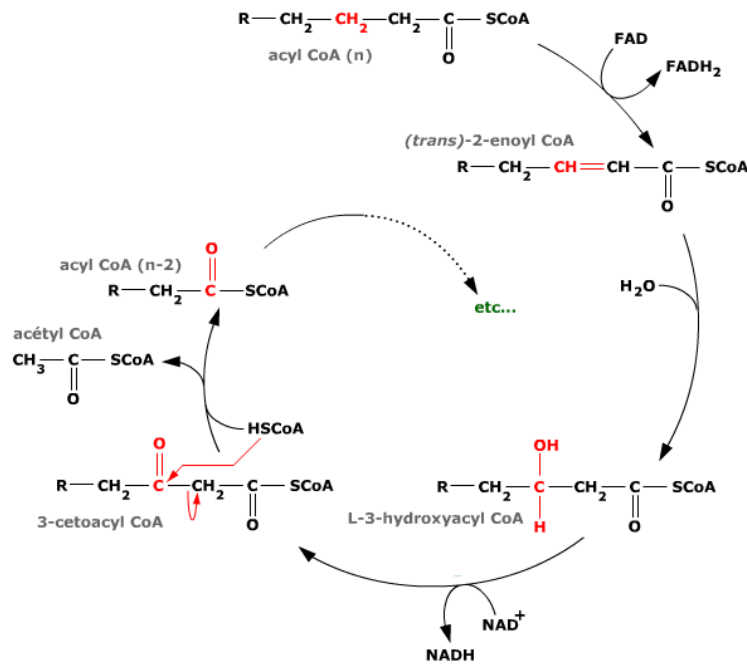


Figure 24 : Schéma de la β -oxydation. D'après (Vincent, 2010).

La vitesse de formation d'énergie à partir de l'oxydation des acides gras est très lente. Bien que cette réserve d'énergie soit très importante, son intervention nécessite un certain délai et pour une intensité d'exercice nettement sous-maximale.

II.2.e. Conclusion sur le métabolisme énergétique musculaire et interconnexion entre métabolismes glucidique et lipidique

Une fibre musculaire dispose donc de trois façons différentes pour former de l'ATP (Figure 25) :

1. La phosphorylation de l'ADP par la créatine phosphate (PCr)
2. La phosphorylation de l'ADP par la voie glycolytique, dans le cytosol
3. La phosphorylation oxydative (cycle de Krebs et β -oxydation) de l'ADP dans la mitochondrie

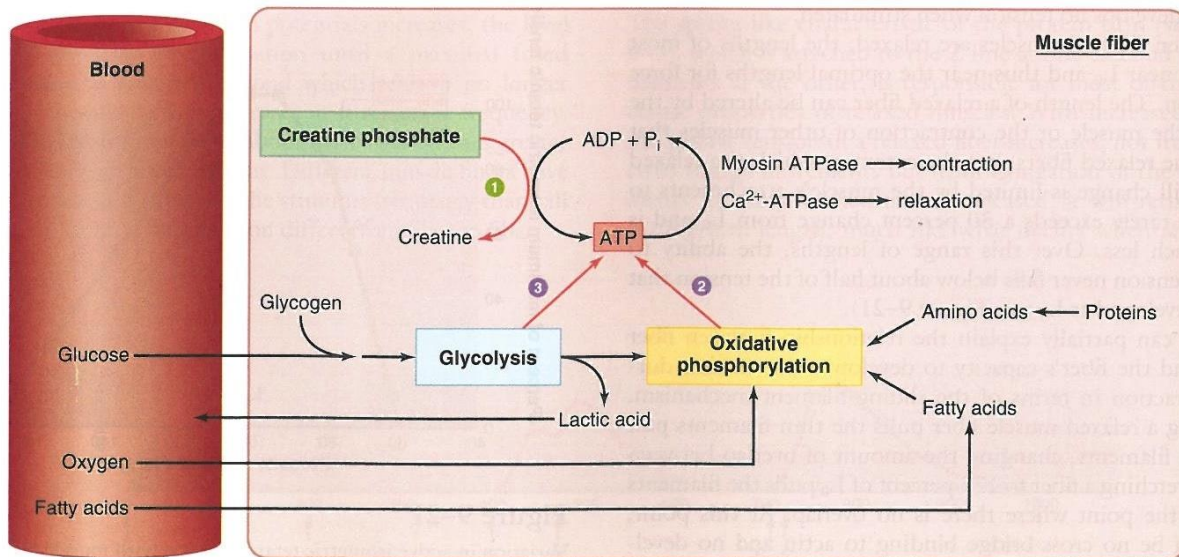


Figure 25 : Les trois sources de production d'ATP pendant la contraction musculaire. D'après (Widmaier *et al.*, 2008).

II.3. Réseau microvasculaire du muscle et son étude

L'ensemble des vaisseaux sanguins forme un circuit fermé, de type système porte, composé des artères et des artérioles qui amènent le sang riche en oxygène et en nutriment (notamment en glucose mais aussi en AGL ou TG) depuis le cœur vers les capillaires du tissu musculaire où ont lieu les échanges avec les myocytes, puis des capillaires vers les veinules et les veines qui ramènent le sang appauvri en oxygène et chargé en molécules/ions issus de la contraction (lactate, H^+ , K^+ , P_i par exemple) vers le cœur. Une des fonctions essentielles de la circulation est d'assurer l'apport en oxygène mais aussi en nutriment en adéquation avec la demande métabolique cellulaire.

Le muscle strié squelettique est alimenté par une ou plusieurs artères nourricières qui se ramifient en un réseau de petites artères et artérioles. Ces différentes ramifications, telles l'arborescence d'un arbre, conduisent à la formation du réseau capillaire comprenant de nombreuses anastomoses. A leur autre extrémité, les capillaires aboutissent aux veinules qui se regroupent entre elles pour former les veines (Figure 26). Il n'existe donc pas de véritable séparation anatomique entre la macrocirculation et la microcirculation. La géométrie des différents vaisseaux sanguins, principalement le diamètre de la lumière du vaisseau et l'épaisseur de la paroi, constituent donc des facteurs morphométriques déterminants de la circulation.

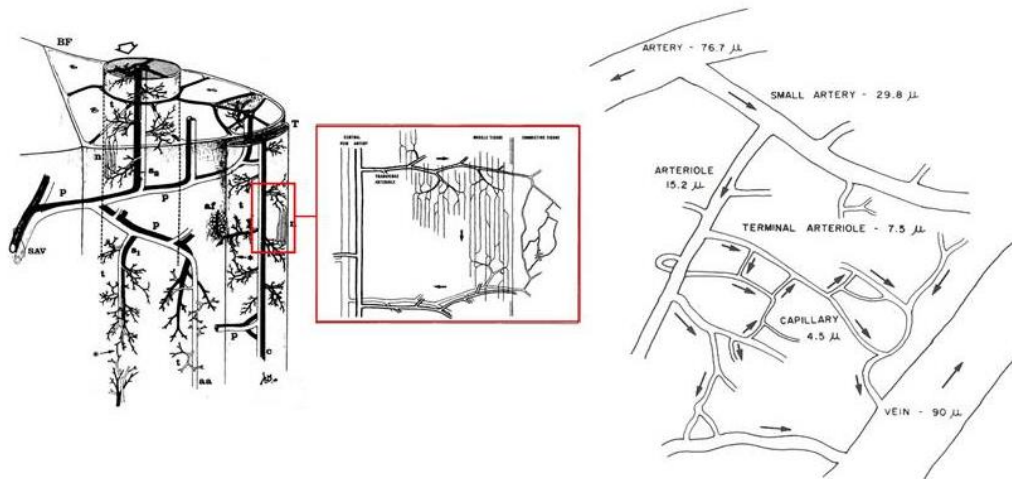


Figure 26 : Arborescence du réseau vasculaire dans le muscle squelettique. D'après (Myrhage et Eriksson, 1984).

II.3.a. Artères et artérioles

Le débit sanguin d'un organe est contrôlé en amont du réseau capillaire par le tonus vasculaire comprenant le réseau artériel et artériolaire.

La paroi des artères est constituée de trois couches qui entourent la lumière vasculaire (Figure 26). On retrouve, de la plus interne à la plus externe :

L'intima : elle est principalement constituée de cellules épithéliales constituant l'endothélium et d'une couche de tissu conjonctif lâche, séparés par une lame basale. L'endothélium est en contact direct avec le sang et les métabolites circulants. Cette surface lisse permet de réduire au minimum la friction entre le sang et la surface interne des vaisseaux.

La media : elle est principalement constituée de cellules musculaires lisses disposées en anneaux et de composants extracellulaires (élastine, collagène, protéoglycanes). Les neurofibres vasomotrices du système nerveux sympathique contrôlent l'activité du muscle lisse vasculaire suivant les besoins de l'organisme. Ainsi, une vasoconstriction (contraction du muscle lisse conduisant à la réduction du calibre) ou une vasodilatation (relâchement du muscle lisse conduisant à une augmentation du calibre) pourront être générées. Cette capacité de contraction et de relâchement de la paroi des vaisseaux peut être englobée sous le terme de vasomotricité. Etant donné que des variations de diamètre des vaisseaux sanguins ont des effets marqués sur le débit et la pression du sang, la *media* joue un rôle important dans la régulation de la circulation sanguine.

L'adventice : c'est un tissu conjonctif principalement composé de fibres de collagènes lâchement entrelacées qui protègent les vaisseaux contre un étirement mécanique exagéré et les ancrent aux structures environnantes.

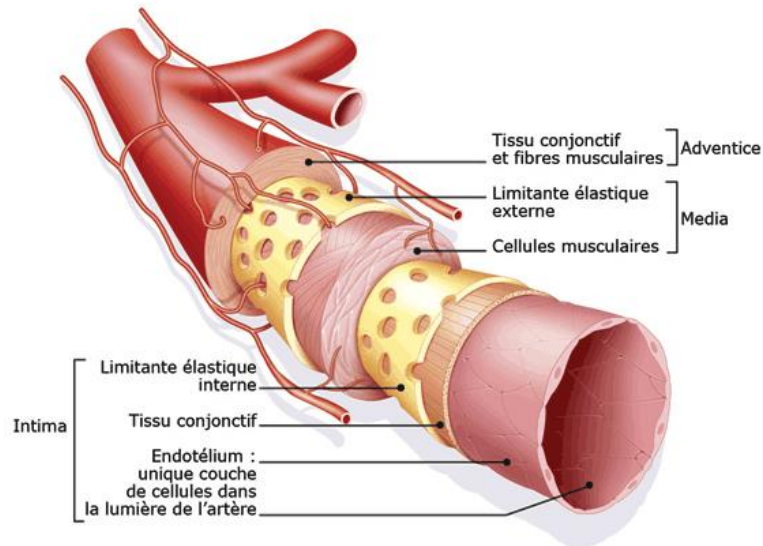


Figure 27 : Représentation d'une artère et de ses trois couches concentriques. Copyright © Sanofi Aventis France.

Les artères musculaires apportent le sang oxygéné aux tissus, dont le muscle squelettique. Leur *media* est la couche la plus épaisse et contient un nombre important de cellules musculaires lisses leur pourvoyant un rôle plus actif dans la vasomotricité que les plus grosses artères (artères élastiques). Cependant, ayant moins de fibres élastiques, elles sont moins extensibles.

Les artérioles sont les plus petites des artères. Elles sont responsables du tonus vasculaire et régulent la distribution du débit sanguin dans le lit capillaire. Ainsi, elles sont les principaux contributeurs des résistances périphériques. Les plus grosses artérioles sont composées des trois couches, mais leur *media* est presque seulement dotée de cellules musculaires lisses et de quelques rares fibres élastiques. Au fur et à mesure de leur parcours vers le réseau capillaire, les artérioles se ramifient, leur diamètre diminue et leur constitution change. Les plus petites artérioles, qui aboutissent aux capillaires ne sont constituées que d'une seule couche de cellules musculaires lisses, enroulées en spirale autour de l'endothélium de l'*intima*.

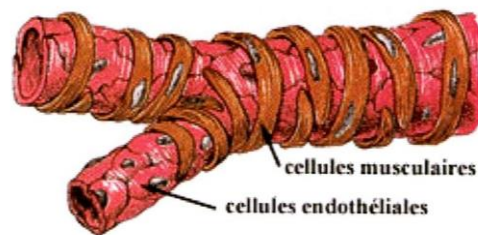


Figure 28 : Représentation d'une artériole. D'après (Vincent, 2010).

L'écoulement du sang dans le lit capillaire est donc déterminé par la vasomotricité des artérioles. Par son action sur le diamètre des artères musculaires et les artérioles, le système nerveux autonome peut moduler la distribution du sang dans les organes selon leurs besoins physiologiques. Même s'il existe une action vasomotrice sur les artères musculaires, ce sont les artérioles qui détiennent le rôle prépondérant dans la répartition et la régulation du débit sanguin, agissant comme des conduits réglables. En effet, la paroi musculaire des artérioles permet des modifications de diamètre qui ont une influence considérable sur la pression artérielle. Ceci s'explique par la loi de Poiseuille qui montre que la résistance d'un vaisseau est inversement proportionnelle à la puissance 4 de son rayon. L'écoulement du sang est donc fortement influencé par la vasomotricité et est dépendant du tonus vasculaire des artérioles :

$$R = 8 \eta L / \pi r^4 \quad R = \text{résistance de l'écoulement, en Pa.s.m}^{-3}$$

η = viscosité, en Pa.s

L = longueur du conduit, en m

r = rayon du conduit, en m

La capacité de contraction des cellules musculaires lisses est sous le contrôle de facteurs à la fois extrinsèque (système nerveux central, vu plus haut) et intrinsèque (tonus myogénique et cellule endothéliale), ainsi que de substances vasoactives présentes dans le sang telles que les catécholamines, l'angiotensine II et la vasopressine. Le tonus myogénique, indépendant de toute influence neuro-hormonale, est la contraction des cellules musculaires lisses en réponse à une augmentation de pression intravasculaire. Ce tonus myogénique a une amplitude qui augmente au fur et à mesure que le diamètre des vaisseaux diminue. Ainsi, bien qu'il soit quasi-imperceptible au niveau des artères, il est très important au niveau des artérioles et devient maximum au niveau des artérioles pré-capillaires. De ce fait, au niveau des artérioles on peut trouver une diminution de la lumière vasculaire allant même jusqu'à l'occlusion complète suite à l'importance du tonus myogénique qui provoque une

augmentation de la pression intravasculaire. Lors d'une augmentation de pression artérielle, la paroi des capillaires étant fine (*vide infra*), elle ne serait pas capable de supporter sans dommage cette augmentation de pression. Or on observe une distension de la paroi artérielle et une activation du tonus myogénique et des résistances hémodynamiques. Le tonus myogénique permet donc de protéger le réseau capillaire d'une hypertension locale.

D'autres mécanismes sont également susceptibles de modifier le tonus artériolaire. La cellule endothéliale peut modifier l'activité contractile des cellules musculaires lisses. Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO), excrété par l'endothélium, est un acteur vasoactif majeur de la régulation de ce tonus. Le NO diffuse dans les cellules musculaires lisses de la paroi artériolaire et induit une vasodilatation locale en s'opposant à l'entrée du calcium. La production de NO est augmentée par les forces de cisaillement, dépendantes de la viscosité, exercées par l'écoulement du sang sur les cellules endothéliales. Le NO diffuse également dans le sang et réagit avec l'hémoglobine, provoquant la formation d'ions nitrates (NO_3^-) et de méthémoglobine. Ainsi, l'hémoglobine joue un rôle de piège de NO. On peut noter que l'hémoglobine intra-érythrocytaire réagit avec la cellule endothéliale six mille fois moins que l'hémoglobine plasmatique libre en raison du plus grand espace de diffusion entre l'hémoglobine intra-érythrocytaire et cette même cellule endothéliale (Gladwin *et al.*, 2004a).

II.3.b. Capillaires

A leurs extrémités, les artérioles se ramifient en capillaires qui ont un diamètre entre 4,7 et 5,9 μm (Eriksson et Myrhage, 1972). Les capillaires sont les plus petits vaisseaux sanguins. La structure histologique du capillaire est dépourvue de cellules musculaires lisses. Leurs parois très fines (de l'ordre de 0,5 μm) ne sont composées que de cellules endothéliales, recouvertes d'une lame basale (Figure 29). Le réseau capillaire varie d'un organe à l'autre en termes d'architecture et de densité.

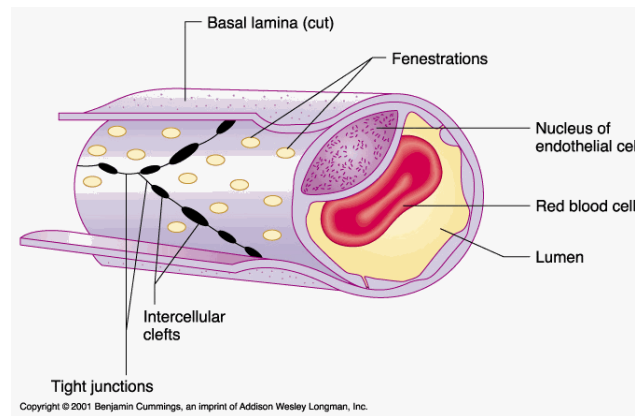


Figure 29 : Structure d'un capillaire. D'après (Widmaier *et al.*, 2008).

Au sein de l'organisme, la distribution des capillaires varie selon l'activité du tissu. En effet, on va retrouver très peu de capillaires au niveau des tendons et des ligaments et aucun capillaire au niveau des épithéliums et des cartilages, alors que les muscles squelettiques, les reins et le foie sont richement vascularisés. Dans le muscle, on a longtemps illustré le fait que l'orientation des capillaires était principalement parallèle aux myocytes. En réalité il existe dans le muscle squelettique une tortuosité capillaire (Figure 30) plus ou moins importante et de nombreuses anastomoses entre les capillaires.

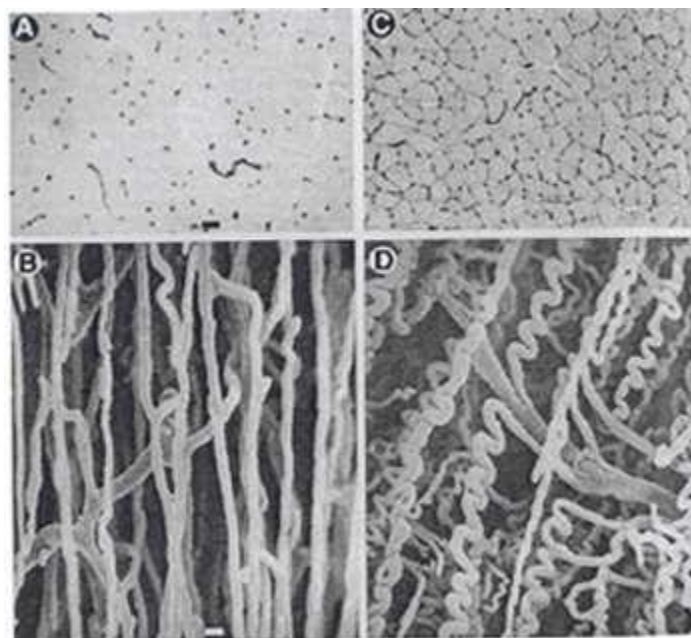


Figure 30 : Représentation de la tortuosité capillaire en 2D et 3D. D'après (Hudlicka *et al.*, 2004).

A et C (Représentation 2D) : Capillaires observés sur coupes transversales de fibres musculaires en microscopie optique ; **B et D (Représentation 3D) :** Capillaires observés après digestion des fibres musculaires en microscopie électronique.

Ainsi, un certain nombre de capillaire est en contact avec une fibre. Entre le muscle et le sang, le réseau capillaire permet d'apporter l'oxygène et les substrats énergétiques aux fibres musculaires, d'évacuer le dioxyde de carbone et les métabolites des fibres et également d'assurer les échanges aussi bien de nature thermique, endocrinienne et/ou osmotique.

D'un point de vue structural, les capillaires se divisent en trois types différents, caractérisés par leurs cellules endothéliales :

- les capillaires continus, qui sont très abondants dans la peau et dans les muscles squelettiques. Leurs cellules endothéliales forment une structure tubulaire ininterrompue et sont réunies entre elles latéralement par des jonctions serrées.

- les capillaires fenestrés se trouvent dans les organes où se produisent une absorption capillaire ou une formation de filtrats importants, tels que l'intestin grêle et les glomérules rénaux. Leur particularité est que certaines de leurs cellules endothéliales sont percées de pores (fenestrations) et sont recouvertes par une fine couche moléculaire.

- les capillaires sinusoides ou capillaires discontinus relient les artérioles et les veinules dans le foie, la rate, la moelle osseuse et certaines glandes endocrines. Ces capillaires sont caractérisés par un diamètre plus grand, de grandes lumières irrégulières et des espaces (trous) importants entre les cellules endothéliales. Leurs endothéliums sont également différents, avec des jonctions serrées moins nombreuses. Leur structure facilite les échanges des macromolécules organiques entre le sang du compartiment vasculaire et le liquide du compartiment interstitiel, et vice versa.

La perfusion capillaire est déterminée par le flux et la densité capillaire. Le flux capillaire dépend du débit sanguin à l'entrée du réseau capillaire et la pression de perfusion capillaire qui elle, varie selon la résistance artériolaire pré-capillaire, la pression tissulaire interstitielle et les conditions rhéologiques sanguines. Lorsque le sang arrive au niveau des capillaires, les globules rouges s'écoulent au centre du vaisseau, laissant au contact des parois vasculaires un manchon plasmatique (Figure 31). Par ailleurs, Parthasarathi et Lipowsky (1999) ont observé que le recrutement des capillaires était affecté quand ils injectaient dans le muscle *cremaster* du rat des globules rouges humains, qui sont plus grands que ceux des rats (Parthasarathi et Lipowsky, 1999). Les auteurs ont montré qu'en condition d'hypoxie, après injection des globules rouges humains, il y avait une redistribution des globules rouges moins déformables vers les vaisseaux plus large, et que le réseau capillaire était perfusé majoritairement en plasma, phénomène appelé « *plasma skimming* ».

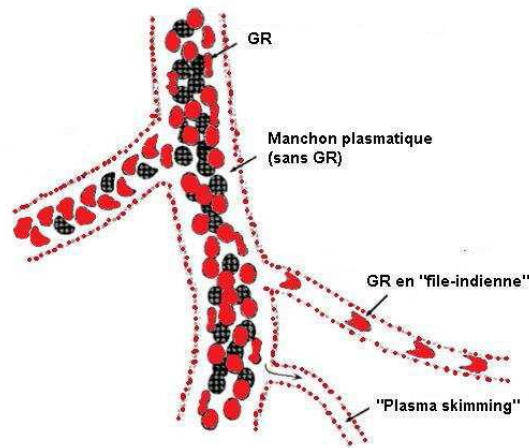


Figure 31 : Circulation sanguine au niveau de la microcirculation. D'après (McHedlishvili et Maeda, 2001).

Cette accumulation axiale des hématies induit une vitesse d'écoulement supérieure par rapport au manchon plasmatique qui les entoure, avec une baisse de la viscosité apparente ; c'est l'effet Fahraeus-Lindqvist. En effet, House et Lipowsky (1980) ont montré que l'hématocrite normalisée était plus faible dans des vaisseaux à plus petits diamètres (Lipowsky *et al.*, 1980), où la diminution de l'hématocrite des microvaisseaux pouvaient être due à l'effet Fahraeus-Lindqvist et à la perfusion hétérogène (Figure 32).

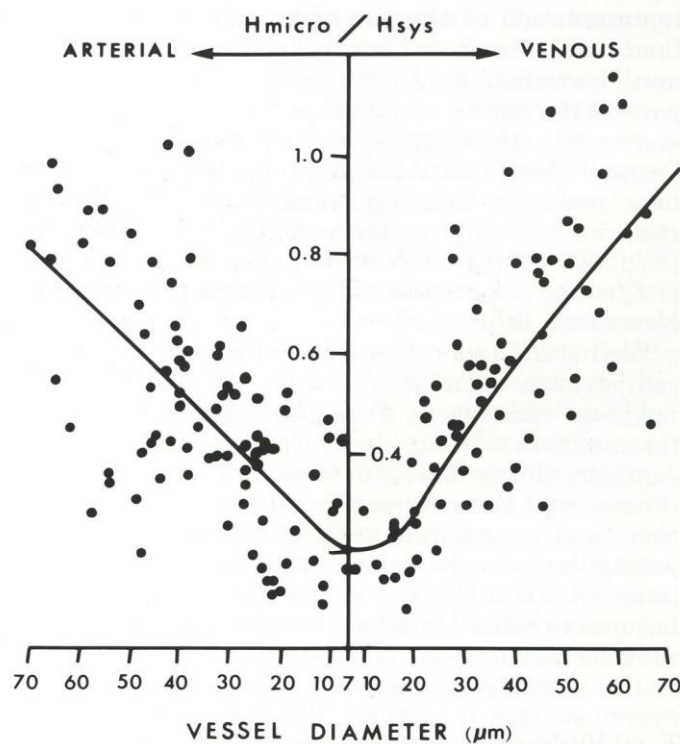


Figure 32 : Diminution de l'hématocrite normalisée (hématocrite des microvaisseaux (H_{micro})/hématocrite systémique (H_{sys})) dans les vaisseaux à plus petits diamètres. D'après (Lipowsky *et al.*, 1980).

Cependant, cette viscosité apparente va augmenter de façon très importante lorsque le diamètre du capillaire devient inférieur à 4 μm (Quemada, 1976). De ce fait, la moindre diminution du diamètre des capillaires aura une conséquence importante sur la perfusion. La perfusion microvasculaire étant hétérogène, cette diversité du calibre des capillaires induira une hétérogénéité des paramètres hémorhéologiques et des demandes en oxygène au niveau microcirculatoire.

II.3.c. Veinules et veines

Les veinules, issues de l'aboutissement des capillaires, ont un diamètre qui varie d'une dizaine de micromètres à une centaine de micromètres. Les veinules post-capillaires sont les plus petites et ont une paroi fine, dépourvue de cellules musculaires lisses. Ainsi, les échanges entre les secteurs plasmatiques et interstitiels peuvent être effectués. Ces veinules convergent ensuite vers des veinules collectrices, qui contiennent des cellules musculaires lisses et une fine tunique externe (*adventice*). Celles-ci déversent dans les veines, dès la sortie des organes et tissus, le sang qui a participé aux échanges dans les capillaires.

Les veines sont composées de trois couches, mais dans l'ensemble, leurs parois sont plus fines et leurs lumières plus grandes que celles des artères (Figure 33). Ainsi, grâce à leurs parois minces et à leurs larges lumières, les veines n'offrent que très peu de résistance à l'écoulement sanguin vers le cœur.

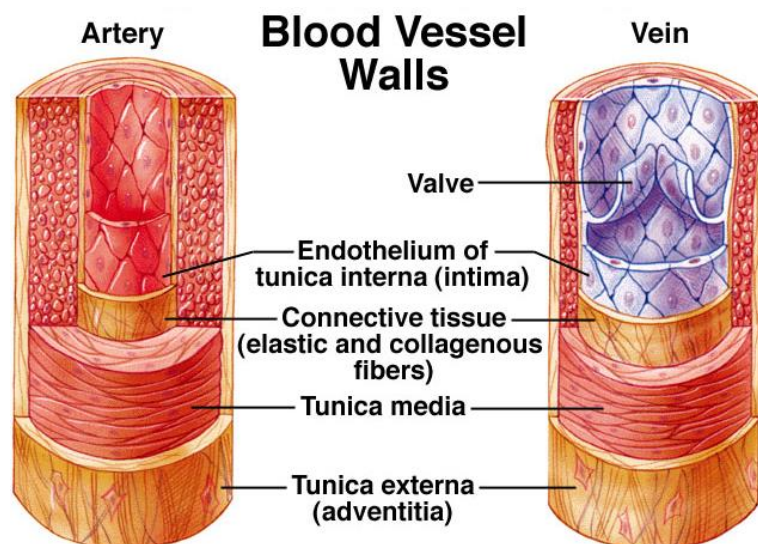


Figure 33 : Comparaison histologique entre une artère et une veine. D'après (Widmaier *et al.*, 2008).

Par ailleurs, la faible présence de cellules musculaires lisses et d'élastine dans leurs parois ne leur permettent pas d'exercer une pression dynamique. Cependant, malgré des parois fines, les veines ne sont pas menacées d'éclater car la pression du sang circulant y est faible. De plus, la circulation veineuse est favorisée par la présence de valvules endoluminales empêchant le reflux du sang.

II.3.d. Facteurs angiogéniques

Le réseau microvasculaire est doté d'une plasticité vasculaire en réponse à divers stimuli, tels que l'ischémie et l'hypoxie (Carmeliet, 2000, Olfert *et al.*, 2001, Breen *et al.*, 2008, Kawada et Ishii, 2008). Les patients drépanocytaires étant sujets à des phénomènes d'ischémie-reperfusion et d'hypoxie tissulaire, on peut ainsi s'attendre à des répercussions sur leur réseau microvasculaire. En réponse à ce type de facteurs de stress, les adaptations du réseau microvasculaire se font *via* le processus d'angiogenèse (Tomanek, 1990, Shweiki *et al.*, 1992, Bloor, 2005, Egginton, 2009). L'angiogenèse est une réaction constituée de plusieurs étapes (Figure 34) aboutissant à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants (Hudlicka *et al.*, 1992, Chung et Ferrara, 2010) :

- Dégradation locale de la membrane basale des cellules endothéliales sous l'effet de diverses protéases en réponse au stimulus
- Prolifération et migration des cellules endothéliales vasculaires (provenant de veinules ou de capillaires) dans l'espace interstitiel
- Formation de bourgeons
- Association des péricytes du côté abluminal une fois le lumen formé
- Production d'une nouvelle membrane basale par les cellules endothéliales et les péricytes
- Formation éventuelle d'anastomoses avec d'autres capillaires.

Ainsi, l'ischémie et l'hypoxie stimulent l'angiogenèse et ont pour conséquence une augmentation de la densité capillaire et une amélioration de la distribution sanguine dans l'organe en question (Hudlicka *et al.*, 1992, White *et al.*, 1998, Carmeliet, 2000).

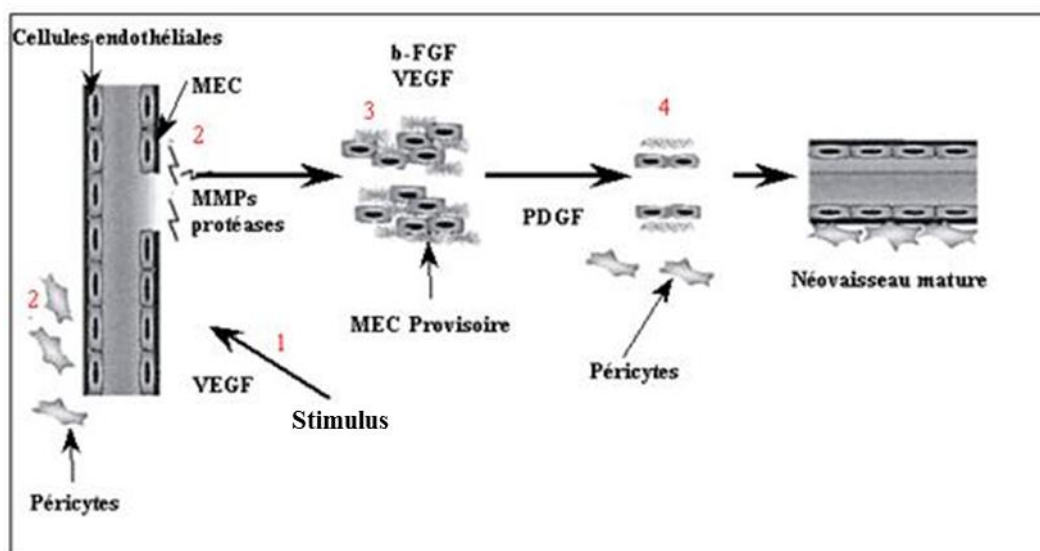


Figure 34 : Processus d'angiogenèse. D'après (Kalluri, 2003).

1 : Activation des cellules endothéliales par VEGF, 2 : Dégradation de la membrane basale et détachement des péricytes, 3 : Prolifération et migration des cellules endothéliales, 4 : Formation d'un néovaisseau. MEC = matrice extra-cellulaire ; MMPs = métalloprotéinases matricielle ; b-FGF = basic Fibroblast Growth Factor ; VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor ; PDGF = Platelet-Derived Growth Factor.

L'angiogenèse est étroitement contrôlée par un certains nombres de facteurs qui sont libérés dans les tissus qui entourent les vaisseaux impliqués. L'homéostasie vasculaire est assurée par un équilibre entre les facteurs pro-angiogéniques et angiostatiques. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est considéré comme l'un des facteurs pro-angiogéniques essentiel et le plus puissant de par son action mitogénique sur les cellules endothéliales. Ainsi, lors d'un stimulus hypoxique, le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1), sensible à l'oxygène, est activé et va induire l'expression du gène VEGF (Shweiki *et al.*, 1992), essentiel pour l'initiation de l'angiogenèse (Figure 34) (Silvestre *et al.*, 2008).

II.3.e. Etude de la microvascularisation du muscle : indices de capillarisation

L'étude du réseau microvasculaire du muscle strié squelettique chez l'homme a été effectuée le plus souvent à partir de fines coupes transversales (de l'ordre de 10 μm), réalisées sur des prélèvements issus de biopsies musculaires. Plusieurs techniques permettent d'analyser les capillaires en microscopie photonique, soit en utilisant les techniques enzymatiques avec l' α -amylase PAS (Andersen, 1975) et la phosphatase alcaline (Ziada *et al.*, 1984), soit à l'aide de techniques immunohistochimiques en marquant des protéines présentes dans les cellules endothéliales ou dans la membrane basale telles que les lectines (Hansen-Smith *et al.*, 1988), le facteur VIII (El-Sayed et Ramadan, 2004), la laminine (Kadi, 2000) ou

le CD31 (Horak *et al.*, 1992). L'analyse de la structure et de la numération des capillaires peut également être réalisée par microscopie électronique (Hermansen et Wachtlova, 1971, Hoppeler, 1984). Pour ce travail doctoral, la technique immunohistochimique utilisant l'anticorps CD31 a été systématiquement utilisée. Une fois marqué, le réseau microvasculaire du muscle peut être étudié en utilisant différents indices morphométriques et fonctionnels.

1. Indices généraux

- La *densité capillaire* (DC, cap.mm^{-2}) correspond au nombre de capillaires dans une surface donnée (Figure 35 A).
- L'indice *C/F* (« capillary to fibre ratio ») correspond au nombre de capillaires divisé par le nombre de fibres préalablement délimité (Figure 35 B).

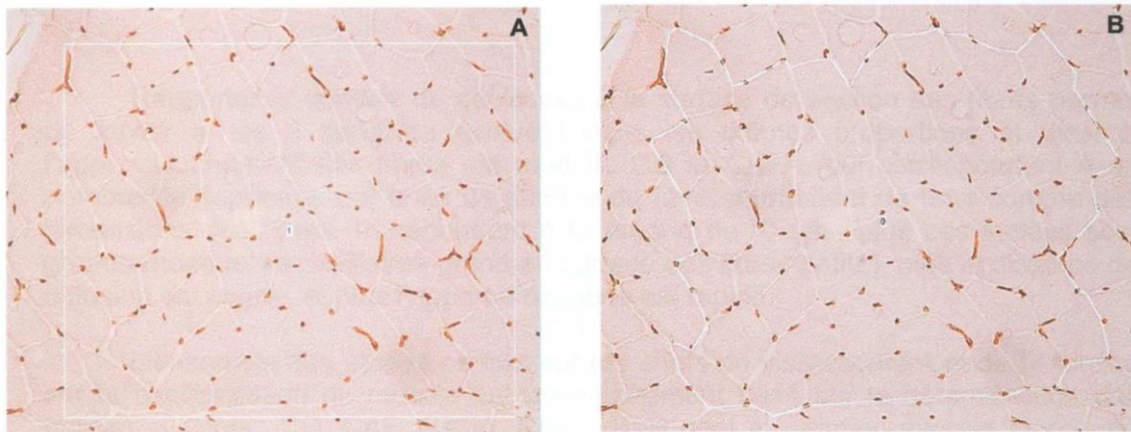


Figure 35 : Calcul des indices DC et C/F. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).

A : Mesure de la densité capillaire, nombre de capillaires dans la surface/aire de la surface (ici représentée par le rectangle blanc) ; B : C/F, nombre de capillaires dans une zone/nombre de fibres dans la même zone.

2. Indices spécifiques aux microvaisseaux (Figure 36)

- *LM* correspond à la longueur des microvaisseaux.
- *PM* correspond au périmètre des microvaisseaux.
- *DEM* ou *COD* (Capillary Outer Diameter) correspond au diamètre externe des microvaisseaux.
- *SM* correspond à la surface de section des microvaisseaux

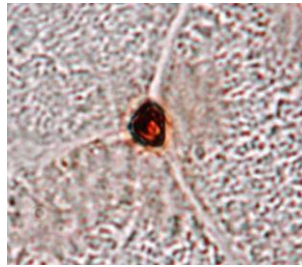


Figure 36 : Identification d'un microvaisseau au CD 31. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).

Cette photo prise à fort grossissement permet l'analyse de ces différents indices : LM, PM, COD et SM.

3. Indices d'interface entre la fibre musculaire et les microvaisseaux

- *CAF* correspond au nombre de capillaires au contact d'une fibre. Dans ce cas un microvaisseau peut être comptabilisé plusieurs fois suivant le nombre de fibres avec lesquelles il est en contact (Figure 38).
- *CFPE* (« capillary-to-fiber-perimeter exchange ratio »), proposé par Hepple (Hepple, 1997), correspond au nombre de capillaires autour d'une fibre/périmètre de la fibre. Le nombre de capillaire (noté C/F_i) est calculé en apportant un facteur correctif, le *sharing factor* (SF, facteur de partage). Ce facteur est directement lié au nombre de fibres qui partagent un capillaire. Ainsi, un capillaire qui est en contact avec deux fibres aura un *sharing factor* de 1/2 (Figure 37).

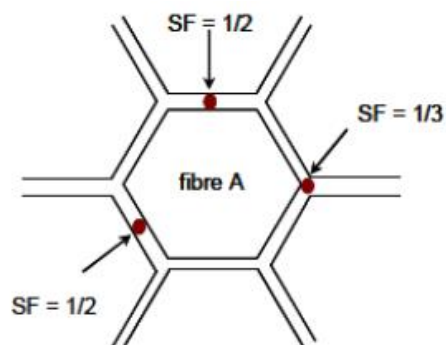


Figure 37 : Calcul du CFPE. D'après (Hepple, 1997).

$C/F_i = 1/2 + 1/2 + 1/3 = 4/3$ (avec la moyenne des C/F_i - C/F global).
 $CFPE = C/F_i / \text{Périmètre de la fibre} = (4/3) / \text{Périmètre fibre A}$.

4. Indices fonctionnels d'échange entre la fibre musculaire et les microvaisseaux

- $CAFA$ ($\text{cap} \cdot \mu\text{m}^{-2}$) correspond à CAF /surface de section de la fibre. Cet indice est représentatif de la distance de diffusion car il tient compte de la surface des fibres. De plus, une augmentation de CAF n'est pas forcément représentative d'une augmentation de la densité capillaire mais peut être le reflet d'une diminution de la surface de section des fibres. Néanmoins, il est important de rapporter le nombre de capillaires à l'aire des fibres pour savoir si l'approvisionnement des fibres en oxygène est modifié (Figure 38).

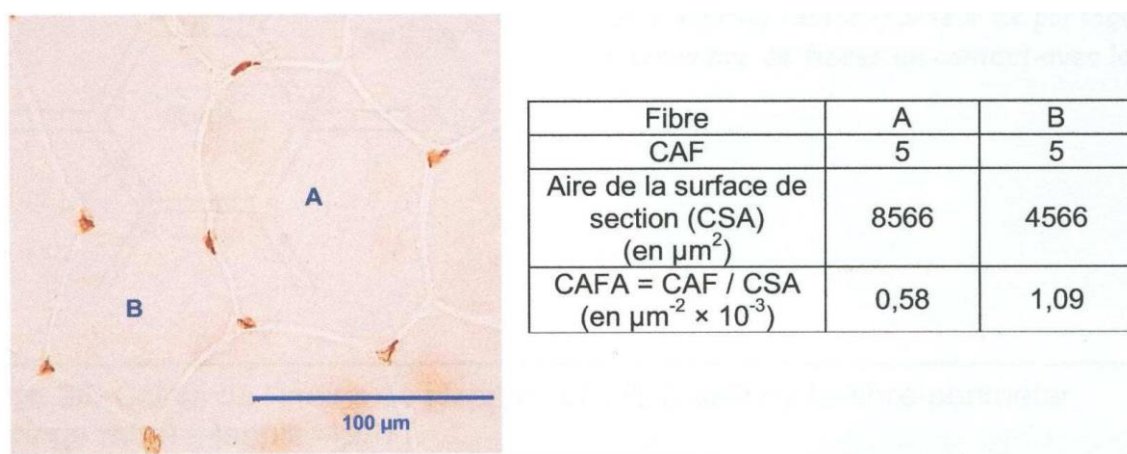


Figure 38 : Exemple de calcul des indices CAF et CAFA de fibres ayant des surfaces de section différentes. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).

- LC/PF (longueur des capillaires au contact de la fibre/périmètre de la fibre, %) correspond au pourcentage de périmètre d'une fibre en contact avec des capillaires (Figure 39). Cet indice mis au point par Sullivan et Pittman (Sullivan et Pittman, 1987) permet d'évaluer la surface d'échange disponible entre une fibre musculaire et les microvaisseaux qui la perfusent. Il a également été utilisé comme indice de la tortuosité capillaire (Charifi *et al.*, 2004).

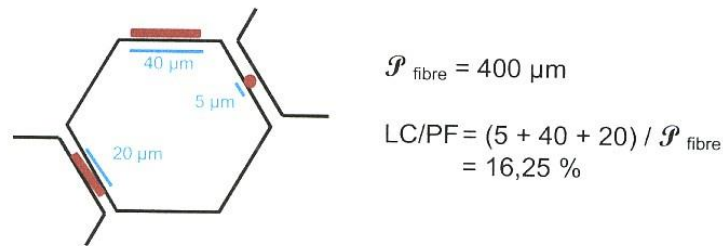


Figure 39 : Calcul du LC/PF (Sullivan et Pittman, 1987). D'après (Charifi, 2006).

LC : somme des longueurs de contact entre les capillaires et la fibre, ici $\text{LC} = 5 + 40 + 20 = 65 \mu\text{m}$

LC/PF : rapport entre la longueur de contact entre les microvaisseaux et la fibre (LC) et le périmètre de cette fibre (PF), ici $\text{LC/PF} = 65/400 = 16,25 \%$.

5. Indice de tortuosité capillaire

Chez les mammifères, l'organisation du réseau microvasculaire montre que les capillaires circulent essentiellement de façon parallèle aux fibres musculaires. Néanmoins, ils présentent une certaine tortuosité qui influe sur leur longueur et sur leur surface de contact avec les fibres (Figure 30). Cette géométrie des capillaires est un facteur important sur le plan fonctionnel car une tortuosité élevée permet d'augmenter le temps de transit du sang et la surface d'échange autour des fibres musculaires, deux facteurs essentiels aux échanges entre le sang et la fibre musculaire.

En représentation 2D (Figure 30), certaines études ont utilisé l'indice LC/PF pour déterminer la tortuosité capillaire (Charifi *et al.*, 2004). Cependant, en limitant la mesure de la longueur du microvaisseau à la zone de contact qu'il possède avec une fibre musculaire, ce paramètre peut dans certains cas ne pas être le reflet de la longueur totale de ce microvaisseau, mais le sous-estimer par rapport à sa taille réelle (Figure 40).

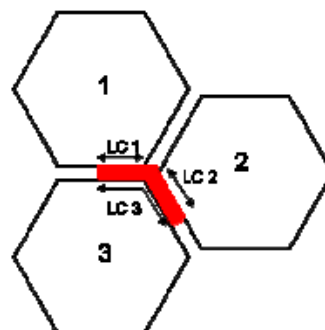


Figure 40 : Représentation de la limite de l'indice LC/PF dans l'analyse de la tortuosité. D'après (Vincent, 2010).

Pour un même microvaisseau, LC1 et LC2 sous-estiment la taille totale du microvaisseau par rapport à sa taille réelle LC3.

En particulier, si fibre et vaisseau ne sont pas parallèles et que ce dernier est coupé en biseau (puisque la coupe histologique est transversale au myocyte), une variation sensible du périmètre du microvaisseau peut être observée et également témoigner de sa tortuosité. De ce fait, lors d'une récente étude sur les sujets SCT réalisée au laboratoire, un nouvel indice de tortuosité (*CapTor*) a été proposé en se basant sur les caractéristiques propres du microvaisseau : la surface de section réelle comparée à la surface de section fictive (minimale théorique) d'un microvaisseau dont le modèle serait un cylindre parfait courant parallèlement aux fibres musculaires (Vincent *et al.*, 2010a).

- *CapTor* (capillary tortuosity) correspond au ratio suivant : $CapTor = SM/\pi(DEM/2)^2$. Plus ce ratio s'éloigne de 1, plus le microvaisseau est tortueux, alors que plus il se rapproche de 1, plus ce microvaisseau est parallèle aux fibres musculaires (cf. Matériel et Méthodes).

Les indices microvasculaires plus particulièrement utilisés au cours de ce travail doctoral seront développés dans la partie « Matériel et Méthodes ».

III. RÉPERCUSSIONS MUSCULAIRES DE LA DRÉPANOCYTOSE HÉTÉROZYGOTE ET HOMOZYGOTE

La drépanocytose est une maladie connue et étudiée depuis le début du 20^{ème} siècle, où le Dr James Herrick fut en 1910 le premier à décrire les caractéristiques des érythrocytes « *sickle shaped* » (Herrick, 1910, Rees *et al.*, 2010). Depuis, la compréhension de cette maladie n'a fait que s'améliorer. Cependant, et bien que son origine et sa physiopathologie aient été abordées dans de très nombreuses études, rares sont les auteurs qui se sont intéressés à ses répercussions sur la structure et la fonction du muscle strié squelettique.

III.1. Répercussions musculaires chez les sujets SCT

III.1.a. Répercussions sur l'aptitude physique

Plusieurs études rapportent les conséquences de la présence de l'HbS sur les aptitudes physiques des sujets SCT. Sans atteindre l'extrême sévérité évoquée précédemment pour d'autres tissus, la restriction dans l'apport en oxygène au niveau des muscles peut limiter les performances sportives, essentiellement dans les disciplines d'endurance sollicitant préférentiellement le métabolisme aérobie (Le Gallais *et al.*, 1994, Thiriet *et al.*, 1994, Connes *et al.*, 2006b). Ces inférences restent toutefois et encore aujourd'hui des hypothèses. Les sujets porteurs du trait drépanocytaire nécessitent une attention particulière lors des activités physiques intenses et prolongées, portant notamment sur une hydratation abondante fondamentale (Bergeron *et al.*, 2004). Cependant, concernant les activités physiques brèves et intenses, la performance des sujets SCT est controversée. En effet, certains auteurs affirment que la diminution du potentiel du métabolisme aérobie pourrait être compensée par un potentiel du métabolisme anaérobie plus développé (Bile *et al.*, 1996), d'où de meilleures performances dans ces disciplines pour les sujets porteurs du trait drépanocytaire par rapport aux sujets contrôles HbAA (Hue *et al.*, 2002, Marlin *et al.*, 2005). Cependant, Connes et collaborateurs (Connes *et al.*, 2006a) ont montré que la capacité des sujets SCT à reproduire une performance anaérobie est diminuée par rapport aux sujets contrôles.

III.1.b. Répercussions sur le tissu musculaire et son réseau microvasculaire

De récents travaux ont été effectués par notre équipe sur l'influence de la présence de l'hémoglobine S sur le muscle strié squelettique des sujets porteurs du trait drépanocytaire (Vincent *et al.*, 2010a, Vincent *et al.*, 2010b). Dans une première étude, il a tout d'abord été montré que la répartition selon les types de fibres musculaires ainsi que l'activité des enzymes

majeures de la glycolyse anaérobie et du cycle de Krebs n'étaient pas modifiées par le trait drépanocytaire. En revanche, une diminution de l'activité de la créatine phosphokinase (CK) et de l'activité enzymatique cytochrome *c* oxydase (COx) chez ces sujets SCT a été constatée. Cette diminution semble concorder avec la moindre performance de ces sujets lors d'un exercice sous-maximal endurant (Le Gallais *et al.*, 1994). Par ailleurs, notre équipe a également décrit, pour la première fois dans cette pathologie, un remodelage important du réseau microvasculaire chez les sujets porteurs du trait drépanocytaire (Vincent *et al.*, 2010a). Une raréfaction et un élargissement significatifs des vaisseaux sont observés, ainsi qu'une diminution de la tortuosité de ces capillaires (Vincent *et al.*, 2010a). Ces particularités du réseau microvasculaire pourraient relever d'une adaptation vis-à-vis des désordres hémorhéologiques rencontrés chez les sujets SCT (viscosité sanguine plus importante et moindre déformabilité érythrocytaire) tout en assurant un apport sanguin approprié aux muscles ou tout au moins en limitant les conséquences de ces désordres (Vincent, 2010).

III.2. Répercussions musculaires suspectées chez les sujets SCA

En 2007, Ejindu et collaborateurs (2007) évoquaient la survenue de vaso-occlusions itératives dans le muscle strié squelettique pouvant faire l'objet d'une réaction inflammatoire *in situ*, d'œdème voire de myonécrose (Ejindu *et al.*, 2007). Par ailleurs, quelques cas cliniques ont rapporté la présence de cas de myonécrose dans les membres (supérieurs ou inférieurs) accompagnée d'une modeste réponse inflammatoire systémique chez des sujets SCA. Ces observations étant relativement rares, la myonécrose n'apparaît donc pas comme une complication majeure de la drépanocytose (Schumacher *et al.*, 1990, Valeriano-Marcet et Kerr, 1991, Mani et Duffy, 1993, Malekgoudarzi et Feffer, 1999).

Cependant, aucun auteur n'a précisément étudié et décrit les caractéristiques histologiques structurales et fonctionnelles du muscle strié squelettique chez les sujets drépanocytaires. Or, comme nous l'avons vu précédemment, dans cette maladie, deux mécanismes physiopathologiques sont susceptibles d'induire des remaniements musculaires :

- la survenue de crises vaso-occlusives répétitives pourrait occasionner des accès d'ischémie aiguë voire plus ou moins chronique et entraîner une souffrance des myocytes et de leur réseau microvasculaire ou à moindre degré induire un remodelage fonctionnel de ce tissu.
- l'existence de l'anémie hémolytique chronique caractéristique de cette maladie pourrait entraîner une limitation de l'apport tissulaire en oxygène et induire une situation d'hypoxie locale chronique, l'hypoxie étant un stimulus majeur des adaptations musculaires.

Même si peu d'études portent sur l'atteinte musculaire de la drépanocytose, il est tout de même possible d'envisager le rôle potentiel de ces deux mécanismes physiopathologiques, crises vaso-occlusives et anémie hémolytique sur le muscle strié squelettique et plus particulièrement sur le métabolisme énergétique et les remodelages microvasculaire et musculaire. Pour aborder ces hypothèses, il paraît légitime de s'appuyer 1) sur les observations rapportées dans la drépanocytose mais issues d'autres tissus, comme la souffrance osseuse ou les remaniements vasculaires cérébraux, 2) sur les observations de modèles ou situations pathologiques pouvant être considérées comme analogues : modèles d'hypoxie chronique influençant la structure et la fonction musculaire comme cela est le cas dans la broncho-pneumopathie chronique obstructive ou l'exposition prolongée à l'altitude.

IV. HYPOTHÈSES

IV.1. Remodelage structural

En 1961, Mauro décrivait la présence de cellules particulières au sein du muscle squelettique et les appelait « cellules satellites » suite à leur localisation à la périphérie des fibres, entre le sarcolemme et la lame basale du muscle (Mauro, 1961). Ces cellules mononucléées sont assimilées à des cellules souches et sont associées au potentiel régénératif bien connu du muscle strié squelettique. Cette propriété repose effectivement sur ce contingent de cellules satellites qui est susceptible de s'activer, proliférer, migrer et fusionner entre elles ou avec les fibres musculaires pré-existantes afin de restaurer le tissu (Abou-Khalil *et al.*, Kadi *et al.*, 2004a, Mackey *et al.*, 2009). Chez des patients en hypoxie continue (atteints d'une broncho-pneumopathie chronique obstructive), il a été observé une amyotrophie (diminution de la surface des fibres) accompagnée d'une fibrose assez prononcée et d'une discrète augmentation des cellules graisseuses interfasciculées (Gosker *et al.*, 2003). De façon similaire, les travaux préliminaires que nous avons réalisés sur quelques sujets ont suggéré une hypotrophie chez les sujets SCA. Mais les premières données d'analyses histologiques n'ont pas rapporté de signes de nécrose, d'infection ou d'inflammation (Delet, 2008). C'est pourquoi, l'étude des cellules satellites pourrait nous renseigner sur l'éventuelle diminution du potentiel régénératif du muscle.

IV.2. Métabolisme énergétique

Les travaux réalisés par notre équipe sur les sujets SCT par rapport aux sujets sains n'ont pas révélé de différence significative concernant les activités PFK, LDH, CS et β -HAD. Cependant, une tendance à une diminution de l'activité CK a été observée. De plus, une activité COx a été mesurée significativement diminuée, par méthode histochimique, sur les fibres de type IIa, majoritaires dans les muscles étudiés (Vincent *et al.*, 2010a, Vincent *et al.*, 2010b). Cela permet de formuler l'hypothèse d'une plus franche altération du métabolisme oxydatif, avec une diminution des activités CS, β -HAD et COx chez les sujets homozygotes à la maladie. L'étude histologique de ce dernier paramètre pourrait non seulement confirmer cette restriction métabolique oxydative mais aussi préciser sa répercussion selon les différents types de fibres musculaires.

IV.3. Remodelage microvasculaire

En ce qui concerne plus spécifiquement le remodelage microvasculaire des sujets SCA, un état d'hypoxémie relative et chronique lié à l'anémie chronique et à la désaturation artérielle de l'oxyhémoglobine a été identifié (Setty *et al.*, 2003, Quinn et Ahmad, 2005, Quinn et Sargent, 2008) et pourrait conduire à des épisodes d'hypoxie tissulaire (Nahavandi *et al.*, 2009, Waltz *et al.*, 2012b). C'est pourquoi, un stimulus angiogénique serait attendu chez ces sujets. Curieusement, nos résultats obtenus dans une population de sujets SCT ont mis en évidence une diminution de la densité capillaire (Vincent *et al.*, 2010a). En accord avec ce résultat, des résultats similaires ont été obtenus chez les sujets en hypoxie continue, en l'occurrence des patients atteints d'une broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). En effet, Whittom et collaborateurs (1998) ont montré une diminution du nombre de capillaires au contact d'une même fibre dans le muscle de sujets BPCO (Whittom *et al.*, 1998). De même, des modifications métaboliques énergétiques au détriment du potentiel oxydatif (diminution des activités enzymatiques oxydatives corrélée à une diminution de fibres de type I) ont été mises en évidence chez des sujets BPCO (Gosker *et al.*, 2003). Encore une fois, ces résultats corroborent ceux que nous avons obtenus chez des sujets SCT (Vincent *et al.*, 2010b). La raréfaction et l'élargissement des vaisseaux ainsi que la diminution de la tortuosité microvasculaire pourraient être au centre du processus physiopathologique musculaire de la drépanocytose. Si ce remodelage microvasculaire est confirmé chez les sujets SCA, ce phénomène témoignerait d'une réponse angiogénique musculaire spécifique dans cette pathologie. A savoir que cette réponse angiogénique particulière, caractérisée par une diminution de la densité capillaire, a également été observée chez des rats en situation d'hypoxie chronique (Olfert *et al.*, 2001) ou en réponse à l'ischémie/reperfusion (Kawada et Ishii, 2008) et chez les patients BPCO (Whittom *et al.*, 1998). L'obtention de telles informations pourraient contribuer à une meilleure connaissance du processus physiopathologique vasculaire décrit au cours de la drépanocytose et de la morbidité qui en découle.

IV.4. Effet genre

Concernant l'effet genre dans la drépanocytose, il n'y a pas de différence physiopathologique décrite dans la littérature. On pourrait donc s'attendre à retrouver les mêmes répercussions musculaires chez les femmes SCA et à un moindre degré chez les femmes SCT. Cependant, les femmes SCA ont un taux d'HbF plus élevé que celui des

hommes (Nagel et Ranney, 1990, Steinberg *et al.*, 1995, Nath *et al.*, 2004), or l'HbF joue un rôle « protecteur » (Sunshine *et al.*, 1979, Platt *et al.*, 1991, Platt *et al.*, 1994) dans la maladie. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que le muscle des femmes drépanocytaires pourrait être moins affecté que le muscle des hommes SCA.

OBJECTIFS

Les résultats de nos premiers travaux (Vincent *et al.*, 2010a, Vincent *et al.*, 2010b), qui ont montré un remodelage musculaire et microvasculaire chez les sujets porteurs du trait drépanocytaire, incitent à poursuivre ces études sur le statut musculaire des sujets homozygotes, SCA. Le but de ce travail doctoral a été de poursuivre l'étude du réseau microvasculaire et les analyses du métabolisme énergétique du muscle de sujets drépanocytaires SCA *versus* sujets contrôles CON et sujets hétérozygotes SCT. Nos hypothèses reposent notamment sur le fait que le remodelage musculaire observé chez les sujets porteurs du trait drépanocytaire pourrait être amplifié dans le muscle des sujets drépanocytaires en raison de leur taux d'HbS plus important.

Par ailleurs, nous avons souhaité compléter ce travail par l'étude histomorphologique du muscle et de son potentiel régénératif par les cellules satellites dans le but de confirmer et de comprendre l'amyotrophie suspectée chez ces sujets SCA.

Ce travail s'appuie essentiellement sur des analyses histologiques sériées. Nous nous sommes intéressés simultanément aux répercussions musculaires et microvasculaires pouvant relever de l'anémie chronique et des crises vaso-occlusives en se focalisant sur :

- le remodelage microvasculaire évalué par la densité capillaire et les mesures du calibre et de la tortuosité des microvaisseaux
- les caractéristiques fonctionnelles énergétiques musculaires, avec l'étude de la typologie des myocytes et d'un témoin de l'activité oxydative métabolique (activité COx), accompagnée de mesures enzymatiques par spectrofluorimétrie.
- le remodelage musculaire, par l'analyse morphométrique des fibres (aire, périmètre, fibrose), la recherche de signes dégénératifs (nombres de cellules nécrotiques, involution adipeuse, inflammation, expression immunohistochimique sarcolemmique du complexe d'histocompatibilité de classe I -HLA Classe I-) et de signes régénératifs (fibres segmentées, centralisation nucléaire, expression immunohistochimique cytoplasmique -CD56- de régénération des myocytes), ainsi que l'étude de la population des cellules satellites (marquage immunohistochimique CD56).

La deuxième partie de ce travail a pour but d'analyser ces répercussions structurales, énergétiques et microvasculaires du muscle strié squelettique sur une population drépanocytaire féminine, et ainsi de confirmer ou infirmer un effet suspecté, lié au genre.

MATERIEL ET METHODES

I. POPULATION ETUDIÉE

Les travaux scientifiques reposent sur l'analyse de biopsies musculaires réalisées dans le muscle *vastus lateralis* de sujets camerounais volontaires. Ces sujets se répartissent en trois groupes selon leur statut hémoglobinique : des sujets sains (HbAA), des sujets porteurs du trait drépanocytaires (HbAS) et des sujets drépanocytaires (HbSS). Les sujets ont été recrutés par diverses voies de communication. Ils ont ensuite pris part à une visite médicale d'inclusion comportant:

- un examen médical complet
- une numération formule sanguine (NFS)
- une hématologie de base
- un bilan de coagulation
- le dépistage du VIH
- le dépistage de l'hémoglobine S
- le dépistage de thalassémies
- les mesures anthropométriques (taille, masse)

Les sujets ont été exclus du protocole après l'examen médical si :

- ils présentaient une hémoglobinopathie autre que la drépanocytose
- ils avaient souffert d'une crise de paludisme dans les deux mois précédant le protocole
- ils présentaient une manifestation clinique d'intolérance locale ou générale à l'exercice
- ils participaient au même moment à une autre recherche médicale
- ils suivaient un traitement médicamenteux (anti-inflammatoire en particulier)
- ils étaient porteurs du VIH

56 sujets camerounais ont été retenus et inclus dans l'étude et répartis en 3 groupes selon leur statut hémoglobinique et en sous-groupe selon leur sexe.

Dans le cadre de l'étude 1, seuls les résultats obtenus chez les hommes seront présentés, portant sur un échantillon de 27 sujets (10 CON, 10 SCT et 7 SCA), présentés dans le tableau 3.

	CON	SCT	SCD
n	10	10	7
Age	24,9 ± 2,4	23,3 ± 2,9	24,3 ± 5,2
Taille (cm)	176,4 ± 1,8	176,4 ± 1,4	171,4 ± 2,8
Poids (kg)	72,0 ± 2,1	68,1 ± 1,9	59,4 ± 2,6
HbS (%)	na	34,19 ± 5,75 (28,9-38,8)	80,90 ± 2,02 (65,9-83,5)
HbA1 (%)	97,92 ± 0,49 (97,7-98,2)	63,77 ± 1,92 (57,9-72,6)	na
HbA2 (%)	2,08 ± 0,15 (1,8-2,3)	4,5 ± 0,97 (2,5-5,3)	7,49 ± 0,63 (5,4-9,4)
HbF (%)	nm	0,08 ± 0,25 (0,0-0,8)	4,63 ± 1,36 (0,6-7,0)
Hb (g/dl)	14,12 ± 0,34 (12,9-15,7)	13,44 ± 0,30 (12,4-14,2)	8,76 ± 0,57 (7,5-10,7)

Tableau 3 : Population masculine étudiée.

Les valeurs représentent les moyennes ± erreur standard. Les valeurs entre parenthèses représentent la valeur minimale et la valeur maximale. na : non applicable, nm : non mesuré.

Dans le cadre de l'étude 2, les résultats obtenus chez les femmes (10 CON, 10 SCT et 9 SCA) seront présentés (Tableau 4) et comparés à ceux obtenus chez les hommes.

	HbAA	HbAS	HbSS
n	10	10	9
Age	24,9 ± 2,4	23,3 ± 2,9	24,3 ± 5,2
Taille (cm)	161,5 ± 2,9	158,4 ± 2,1	166,4 ± 3,9
Poids (kg)	59,7 ± 2,3	58,3 ± 2,1	60,7 ± 3,8
HbS (%)	na	33,63 ± 0,85 (28,9-38,8)	78,16 ± 1,35 (70,1-82,7)
HbA1 (%)	97,57 ± 0,31 (95,7-98,3)	61,66 ± 1,00 (58,0-67,5)	na
HbA2 (%)	1,98 ± 0,049 (1,7-2,2)	4,34 ± 0,23 (2,7-5,2)	7,37 ± 0,87 (4,5-11,9)
HbF (%)	nm	0,37 ± 0,20 (0,0-1,2)	7,63 ± 1,60 (1,0-17,9)
Hb (g/dl)	11,60 ± 0,34 (9,8-13,3)	11,64 ± 0,22 (10,9-12,7)	7,18 ± 0,44 (4,2-8,9)

Tableau 4 : Population féminine étudiée.

Les valeurs représentent les moyennes ± erreur standard. Les valeurs entre parenthèses représentent la valeur minimale et la valeur maximale.

II. MÉTHODES

II.1. Muscle étudié à partir de la biopsie musculaire

Les biopsies musculaires ont été effectuées au niveau du *vastus lateralis* alors que les sujets étaient allongés sur le dos en position de repos. Les prélèvements musculaires d'environ 150 à 200 mg ont été réalisés selon une procédure bien standardisée et peu invasive à l'aide d'une pince Weil-Blackesley après le rasage de la peau, aseptie (Hibitane) et anesthésie locale (xylocaïne®) sous-cutanée et aponévrotique (Feasson *et al.*, 1997, Feasson *et al.*, 2002). L'incision de 7 à 10 mm de long pratiquée jusqu'au franchissement de l'épimysium a été faite à la jonction du 1/3 inférieur et du 1/3 moyen de la face externe du *vastus lateralis*. La pince Weil-Blackesley a été introduite en position fermée à une profondeur qui est fonction du volume musculaire du sujet. L'ouverture et la fermeture dans le muscle de sa mâchoire de forme ovoïde aux bords affûtés a permis de couper l'échantillon de muscle à étudier (Figure 41). Une compression de 5 minutes a été maintenue pour assurer l'hémostase. L'incision a ensuite été refermée par des bandes adhésives stériles que le patient gardait pendant 5 jours (Feasson *et al.*, 1997). Les sujets revenaient ensuite à J1 et J5 pour deux visites de contrôles.

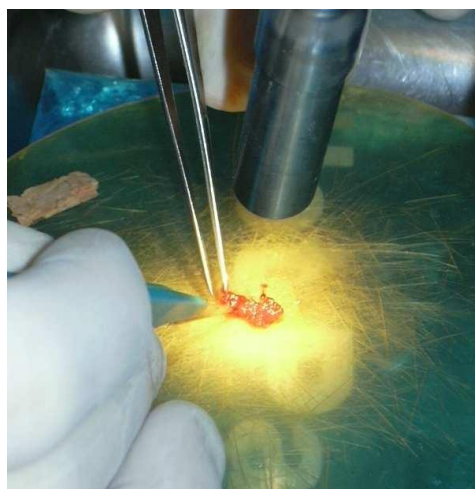


Figure 41 : Prélèvement biopsique. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).

Une fois obtenu, l'échantillon musculaire a été séparé en deux parties. Tout d'abord un faisceau de fibres musculaires correctement structuré a été orienté à l'aide d'une loupe binoculaire et inclus sur un support de liège avec de la colle biologique Cryomount® Histolab puis congelé dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide. Cette préparation permet de

réaliser différentes coupes sériées en vue d'analyses immunohistochimiques et histoenzymatiques. La deuxième partie de l'échantillon a été immédiatement congelée dans de l'azote liquide en vue des analyses biochimiques de type analyse enzymatique. Ces deux échantillons musculaires ont été stockés dans la banque cryogénique de l'Unité de Myologie.

II.2. Analyses histologiques

A partir de ces échantillons musculaires, des coupes sériées de 10 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryostat microtome (Microm HM 560, Microm, Walldorf, Germany) à -20 °C, puis montées sur lames.

II.2.a. Analyse structurale et indice de remodelage musculaire

➤ Typologie

La typologie des fibres musculaires a été réalisée par la caractérisation immunohistochimique des isoformes des chaînes lourdes de myosine : MHC I ou MHC II. Les anticorps utilisés sont les suivants :

- Deux anticorps primaires monoclonaux IgG1 de souris anti MHC humains ont été utilisés :
 - A4 : anticorps monoclonal 4.951 Alexis platform® (ALX-805-502) reconnaissant très spécifiquement les MHC I
 - N2 : anticorps monoclonal N2.261 Alexis platform® (ALX-805-505) reconnaissant plus spécifiquement les MHC IIa.
- Un anticorps secondaire polyclonal lapin anti souris Dako P260
- Un anticorps tertiaire polyclonal porc anti lapin Dako P217

La reconnaissance de l'antigène par les anticorps spécifiques a ensuite été révélée par la réaction chromogène peroxydase couplée à l'anticorps secondaire et tertiaire (Fiche méthodologique 2).

L'observation microscopique de ces fibres a été réalisée à l'aide d'un microscope photonique Nikon Eclipse E400® (grossissement x100). Grâce à la comparaison des résultats obtenus par ces colorations, l'observation microscopique a permis de réaliser un typage précis des différentes fibres musculaires en fibres I, I-IIa, IIa, IIa-IIx et IIx, selon leur niveau d'intensité de coloration plus ou moins forte (Verney *et al.*, 2008, Vincent *et al.*, 2010a, Vincent *et al.*, 2010b). Cette méthode a pu être complétée par la caractérisation de l'activité myosine ATPase, selon la méthode décrite par Brooke et Kaiser en 1970 (Figure 42 et Tableau 5, Fiche méthodologique 1) (Brooke et Kaiser, 1970).

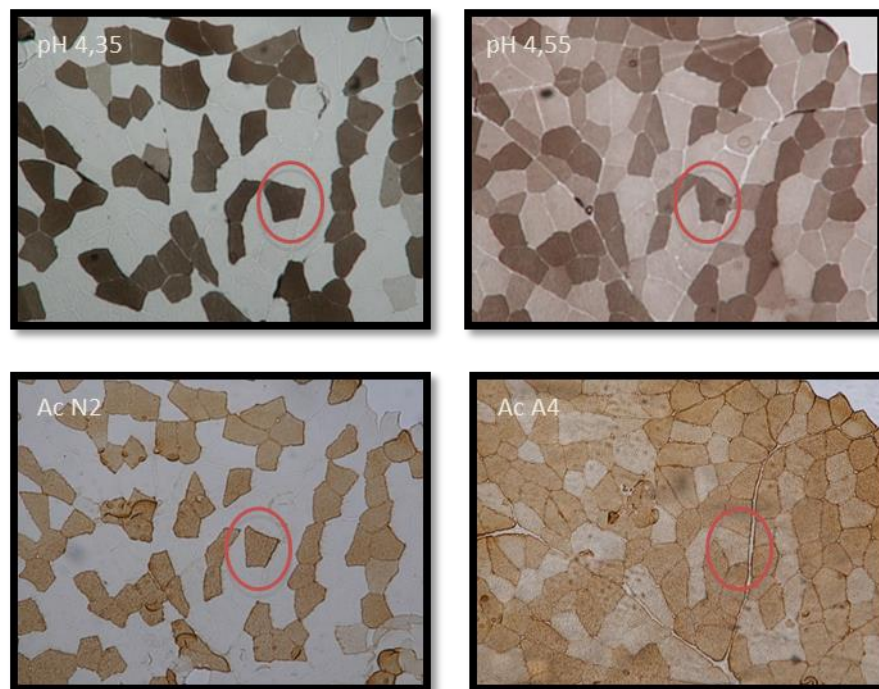


Figure 42 : Typologie du *vastus lateralis* par l'activité ATPasique 4,35 et 4,55 et par immunohistochimie : Ac A4 et Ac N2. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).

	I	I-IIa	IIa	IIa-IIx	IIx
pH 4,35					
pH 4,55					
Ac N2					
Ac A4					

Tableau 5 : Interprétation des différents types de fibres à partir des méthodes ATPasique et immunohistochimique. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).

➤ Analyse morphométrique

L'analyse morphométrique a été réalisée préférentiellement à partir de la préparation ATPase pH 4,55 qui laisse mieux apparaître l'endomysium de chaque fibre. Le logiciel Sigma Scan Pro 5 a permis de mesurer la surface de section transversale, le périmètre et le diamètre des fibres (Figure 43). Le diamètre mesuré était le plus petit diamètre mesurable pour s'assurer d'obtenir un diamètre représentatif de celui de la fibre étant donné que certaines

fibres musculaires ne sont pas toujours parfaitement orientées perpendiculairement au plan de coupe. Pour chaque individu, les valeurs moyennes ont été obtenues par la mesure successive d'environ cent cinquante myocytes par coupe à concurrence de 30 fibres par type (I, IIa, IIx) et sous-type hybride (I-IIa et IIa-IIx).

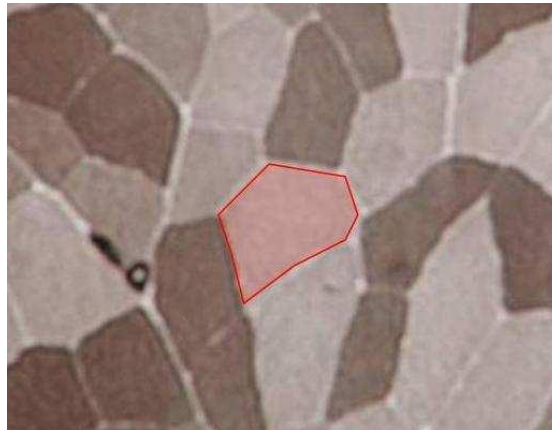


Figure 43 : Représentation de la méthode de mesure de la surface de section des fibres musculaires. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).

➤ Recherche des signes de remodelage tissulaire

La coloration HES nous a permis de rechercher la présence éventuelle de signes de remodelage tissulaire. Certains pourront être le reflet d'un processus dégénératif (cellules nécrotiques, fibrose endomysiale et/ou pérимysiale, involution adipeuse inter-fasciculée, présence d'éléments inflammatoires...), d'autres pourront être en rapport avec un phénomène de régénération (centralisations nucléaires, fibres segmentées) (Figure 44).

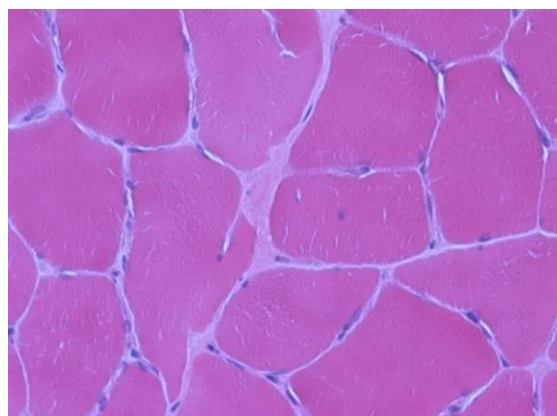


Figure 44 : Représentation d'une fibre segmentée et d'internalisations nucléaires, témoins du potentiel régénératif. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).

L'étude de l'expression immunohistochimique du complexe majeur d'histocompatibilité HLA Classe I a été réalisée à la recherche d'un processus inflammatoire. Par analogie aux situations de pathologies musculaires inflammatoires (myosites), le comptage des myocytes exprimant l'anticorps HLA Classe I au niveau cytoplasmique ou membranaire est susceptible de nous renseigner de l'éventuelle présence d'un processus inflammatoire même en l'absence d'observation évidente d'éléments cellulaires (lymphocytes, macrophages activés...) (Dubowitz, 2007).

➤ Analyse du potentiel régénératif du muscle

Les cellules satellites étant les principales cellules souches myogéniques adultes (Hawke et Garry, 2001), nous nous sommes intéressés au marquage et au comptage de ces cellules. La préparation immunohistochimique utilisant l'anticorps CD56 (Fiche méthodologique 3) nous a permis de révéler et de recenser à la fois les fibres régénérées et/ou les néo fibres ainsi que les cellules satellites (Figure 45).

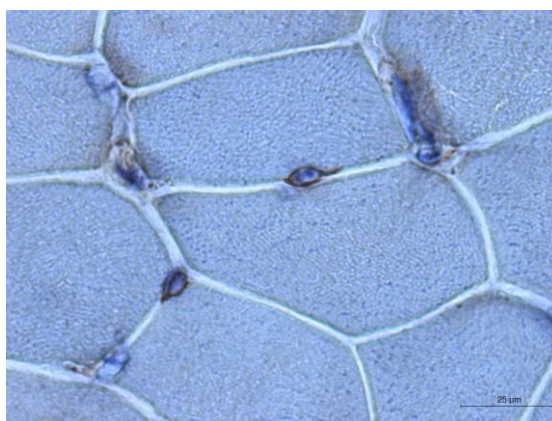


Figure 45 : Cellules satellites marquées à l'anticorps CD56. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).

II.2.b. Enzymologie et activité Cox

➤ Enzymologie

L'analyse des activités enzymatiques a été réalisée par fluorimétrie. Plusieurs étapes doivent être réalisées avant la mesure des activités. Tout d'abord, une partie de l'échantillon musculaire (≈ 10 mg) a été lyophilisé afin de purifier l'échantillon (enlever la partie aqueuse) et de conserver le métabolisme propre de la protéine étudiée. Une fois lyophilisés, les échantillons musculaires ont été disséqués sous une loupe binoculaire afin de ne garder que les fibres musculaires, et 1-2 mg de muscle ont été pesé dans un tube eppendorf. Une solution

de tampon d'extraction a été mélangée à l'échantillon musculaire. Il s'agit d'un tampon conservé à 4°C à 0,1 M d'une solution tampon phosphate (pH = 8,2) contenant 5 mM de 2-mercaptoéthanol, 30 mM de NaF, 5 mM de MgCl₂ et de 0,5 mM d'ATP. Le muscle a ensuite été broyé à l'ultra-thurax. L'homogénat obtenu a été utilisé pour mesurer par fluorimétrie l'activité de cinq différentes enzymes : la créatine kinase (CK), la phosphofructokinase (PFK), la lactate déshydrogénase (LDH), la citrate synthase (CS), et la β-hydroxy-acyl CoA déshydrogénase (β-HAD). Toutes ces activités enzymatiques ont été mesurées à température ambiante et exprimées en μmol.min⁻¹.g⁻¹ de muscle sec. A noter que la mesure de l'activité de la PFK se fait le jour de l'extraction, avant la congélation des homogénats. Le protocole détaillé de ces différentes activités enzymatiques est donné dans la partie « Annexes » (Fiches méthodologiques 4 à 8).

➤ Activité COx

Le cytochrome *c* oxydase (COx) est le quatrième complexe protéique oxydoréducteur de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'analyse de son activité a permis d'apprécier le métabolisme oxydatif des fibres musculaires préalablement typées. L'analyse de l'activité COx a été estimée par mesure de densitométrie sur cliché numérique avec le logiciel Sigma Scan Pro (Fiche méthodologique 9). Les coupes ont été saisies à l'aide d'un microscope Leica DM200 associé à une caméra numérique. Un champ d'environ 150 fibres par muscle a été sélectionné et identifié avec des coupes sériées dédiées à la typologie. Ce champ a été choisi comme étant le plus représentatif possible de l'ensemble de la coupe disponible. Lorsque l'expression de l'activité COx est intense pour une fibre donnée (fibre foncée), on en déduit qu'elle dispose d'une capacité oxydative élevée. En revanche, lorsque l'activité de la fibre demeure faible (fibre claire), on en déduit qu'elle dispose d'une capacité oxydative restreinte (Figure 46).

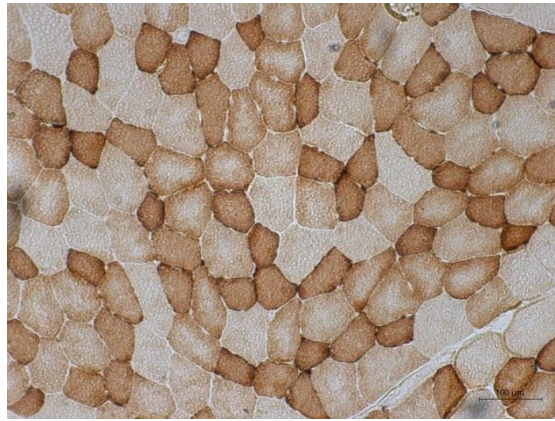


Figure 46 : Préparation histoenzymatique COx sur une coupe transversale d'une biopsie issue d'un muscle *vastus lateralis*. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).

II.2.c. Indice de remodelage microvasculaire

L'analyse des microvaisseaux (Fiche méthodologique 10) a été réalisée à l'aide d'un microscope photonique (Nikon Eclipse E400®, grossissement x100, surmonté d'un appareil photo numérique Nikon Coolpix 990®), suite au marquage de protéines présentes dans les cellules endothéliales des capillaires colorées par un anticorps primaire CD31, par un anticorps secondaire (lapin anti-souris) et tertiaire (porc anti-lapin). Une fois marqués, les microvaisseaux ont été étudiés selon différents indices :

- CD : densité capillaire correspondant au nombre de capillaires dans une surface donnée (en cap/mm²)
- PM : périmètre des microvaisseaux
- COD : diamètre extérieur moyen des microvaisseaux
- CSA : surface des microvaisseaux

CapTor : tortuosité des microvaisseaux, $CSA/\pi(COD/2)^2$ (Figure 47). Cet indice rend compte de la tortuosité des capillaires et donc de la surface d'échange sang-muscle disponible.

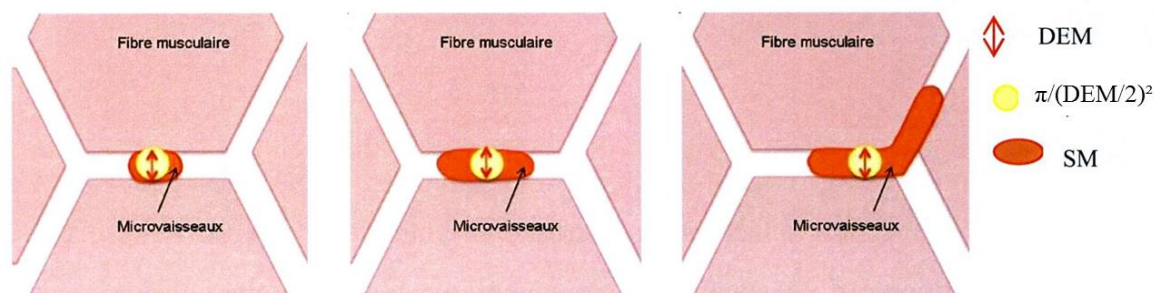


Figure 47 : Représentation de la méthode de calcul de l'indice CapTor.

De gauche à droite : microvaisseaux du moins au plus tortueux. D'après (Vincent *et al.*, 2010a).

II.2.d. Analyses des parois microvasculaires

La mesure de la paroi capillaire a été réalisée à partir de la coloration HES et sur des photos prises à fort grossissement (objectif x40, oculaire x10, couplé au grossissement de la caméra x2,6, donc un grossissement x1040). Grâce au logiciel SigmaScan Pro software (SPSS Science, Chicago, IL, USA), la mesure de la paroi de chaque capillaire a été réalisée en 4 endroits de son périmètre et à 3 reprises. L'épaisseur de la paroi d'un capillaire est obtenue par la valeur moyenne de ces 12 mesures.

L'étude de la qualité de la paroi a été faite en immunohistochimie. La présence ou l'absence de cellules musculaires lisses dans la paroi capillaire a été recherchée grâce à un double marquage en immunofluorescence CD31/SM-MHC (Fiche méthodologique 11). La présence ou l'absence de structure fibreuse et/ou collagénique renforçant la paroi capillaire a été vérifiée grâce à la coloration Van Gieson (Fiche méthodologique 12). Ces deux protocoles sont détaillés dans la partie "Annexes".

II.2.e. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard à la moyenne. Les différents résultats ont été comparés entre les trois groupes au moyen d'une ANOVA à deux facteurs suivi d'un test Fisher. Le niveau de significativité a été fixé à $P < 0,05$. Une tendance a été considérée pour une valeur de P comprise entre $0,1 < P \leq 0,05$. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel Statview® Version 5.0 sous Windows (SAS Institute, Inc.).

ETUDE 1

I. Introduction à l'étude 1

Comme nous l'avons mentionné dans la première partie de ce travail doctoral, la drépanocytose est une hémoglobinopathie conduisant à des désordres hématologiques, hémorhéologiques et hémodynamiques, ce qui déclenche des complications variées pouvant aboutir à la mort.

Concernant les répercussions musculaires de cette maladie, très peu de données sont disponibles dans la littérature et ces dernières concernent les sujets porteurs du trait. Notre équipe a eu l'opportunité de réaliser au Cameroun en 2005, une première étude concernant l'aptitude physique et le tissu musculaire chez les SCT. Dans le domaine de la physiologie de l'exercice, l'hypothèse était que les sujets porteurs du trait disposeraient d'une « orientation métabolique » privilégiant la voie glycolytique anaérobie (Bile *et al.*, 1998, Hue *et al.*, 2002, Marlin *et al.*, 2005). Lors de notre première étude réalisée sur des sujets camerounais porteurs du trait, bien que considérés « asymptomatiques », nous avons pu montrer que le tissu musculaire de ces sujets SCT avait subi un remodelage significatif, à savoir : une diminution de certains indices témoignant de la capacité oxydative, ainsi qu'un remodelage microvasculaire important, caractérisé par une diminution de la densité capillaire et de la tortuosité capillaires, et un élargissement des microvaisseaux (Vincent *et al.*, 2010a, Vincent *et al.*, 2010b).

C'est pourquoi nous nous sommes ensuite intéressés aux répercussions musculaires structurales, énergétiques et microvasculaires potentielles chez les sujets drépanocytaires. Ces éléments sont rapportés dans l'étude 1 suivante.

De retour au Cameroun en 2007 notre équipe a recruté 27 sujets volontaires masculins inscrits à l'université de Yaoundé, ce qui constituait un groupe de population homogène, c'est-à-dire de même milieu socio-économique et ayant le même mode de vie. Ces sujets sont répartis en trois groupes selon leur statut hémoglobinique, à savoir : 10 sujets contrôles (CON), 10 sujets porteurs du trait (SCT) et 7 sujets drépanocytaires (SCA).

II. Article 1

Sickle cell anaemia profoundly affects skeletal muscle and its microvasculature, Ravelojaona et al., 2014.

Actuellement soumis à *British Medical Journal* (**IF : 17,2**)

Sickle cell anaemia profoundly affects skeletal muscle and its microvasculature

Marion Ravelojaona,^{1*} Léonard Féasson,^{1,2*} Samuel Oyono-Enguélé,³ Lucile Vincent,⁴ Ben Djoubairou,³ Charles Ewa'Sama Essoue,³ and Laurent Messonnier⁴

¹ Université de Lyon, Laboratoire de Physiologie de l'Exercice EA4338, Saint Etienne, France
Marion Ravelojaona PhD student and Léonard Féasson associate professor-hospital practitioner, ² Unité de Myologie – Centre Référent Maladies Neuromusculaires Rares Rhône-Alpes – CHU de Saint Etienne, Saint Etienne, France Léonard Féasson associate professor-hospital practitioner, ³ Université de Yaoundé I, Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, Laboratoire de Physiologie, Yaoundé, Cameroun Samuel Oyono-Enguélé professor-hospital practitioner, Ben Djoubairou physician, and Charles Ewa'Sama Essoue physician, ⁴ Université de Savoie, Laboratoire de Physiologie de l'Exercice EA4338, Chambéry, France Lucile Vincent doctor, and Laurent Messonnier professor.

* These authors contributed equally to this work

Correspondence to:

Prof Laurent Messonnier

Laboratoire de Physiologie de l'Exercice EA4338,

Université de Savoie, F-73376 Le Bourget-du-Lac Cedex, France

Phone: +33 4 79 75 81 85

Fax: +33 4 79 75 87 45

Email: laurent.messonnier@univ-savoie.fr

Keywords: sickle cell anaemia, microvascular remodelling, amyotrophy, muscle oxidative capacity.

Word count: 3026

ABSTRACT

Objectives: Sickle cell anaemia (SCA) is a haemoglobinopathy leading to major haematologic, haemorheologic, and haemodynamic disorders that induce various complications including organ failure and ultimately lead to death. This present study assessed for the first time repercussions of sickle cell anaemia on skeletal muscle and its microvasculature.

Design and Setting: Patients with sickle cell anaemia, sickle cell trait (SCT), and healthy controls (CON) were subjected to a muscle biopsy. The study was performed at the General Hospital of Yaoundé, Cameroon, and at the University Hospital of St Etienne, France. Experimenters were blinded to muscle samples groupings.

Participants: 27 Cameroonian volunteer sedentary men participated in the study, and they were assigned to one of the three groups according to their haemoglobin status (CON, n=10; SCT carriers, n=10; and SCA patients, n=7).

Main Outcome Measures: Muscle microvascular, structural, and energetic characteristics.

Results: Sickle cell anaemia was associated with widening of capillary outer diameter ($p<0.0001$) without reinforcement of their wall [testified by lacks of thickening of the wall (ns) and of fibrous tissue and/or smooth muscle in their constitution], microvessels rarefaction ($p<0.0001$), and decrease in capillary tortuosity ($p<0.0001$). Changes in fibre type distribution, a muscle atrophy ($p=0.013$), a rise of satellite cell number ($p<0.0001$), and a decrease in activities of creatine kinase ($p=0.015$) and several oxidative enzymes ($p<0.001$) were also noticed. No signs of tissue necrosis, inflammatory stress, fibrosis or segmented fibres were observed.

Conclusions: It is concluded that sickle cell anaemia induces a profound microvascular remodelling, which leads to microvessels weakening, but apparently maintains local blood flow and tends to reduce risks of entrapment of red blood cells in the microvasculature. Sickle

cell anaemia patients also displayed a significant amyotrophy and an important decrease of muscle oxidative capacities that may partly explain their exercise intolerance.

BOX**Paper adds box**

- Sickle cell anaemia is well known for its haematologic and haemorheologic disorders leading to organ damage and ultimately to death. However no studies have investigated repercussions of sickle cell anaemia on skeletal muscle of these patients known to be exercise intolerant.
- Our study highlights for the first time unique data on a profound remodelling of microvascular, structural and energetic characteristics of skeletal muscle in patients with sickle cell anaemia.

BACKGROUND

Sickle cell anaemia is a genetic haemoglobinopathy leading to synthesis of abnormal haemoglobin (HbS). In its deoxygenated form, the mutated haemoglobin polymerizes, giving the red blood cells their particular sickle shape. Because haemolysis related to the fragility of the sickled erythrocytes is not compensated by erythropoiesis, the first clinical manifestation of the disease is a severe haemolytic anaemia. Sickled red blood cells also display a loss of deformability and an abnormal adhesion to the endothelium that favour the entrapment of erythrocytes in the microvasculature, resulting in vaso-occlusive crises[1] and infarction of vital organs. Resolution of vaso-occlusion episodes amplifies inflammation[2-5] and oxidative stress[4, 6] that contributes to the pathophysiology of sickle cell anaemia and especially the vasculopathy. These vaso-occlusive or vasculopathy phenotypes often result in failure of critical organs such as the spleen, kidneys, liver, brain, lungs, and bones.[7]

Literature related to skeletal muscle in sickle cell anaemia is relatively sparse, maybe because of its less vital nature, but also because sickle myonecrosis episodes are relatively rare complications.[8-12] Yet, richly microvascularized and highly sensitive to hypoxia/anoxia, oxidative stress, and inflammation, skeletal muscle may severely suffer from the disease. Occlusion and ischaemia-reperfusion episodes are known to induce profound microvascular functional and structural remodelling including alterations of capillary perfusion[4] (no reflow phenomena[3, 5]) and a decrease in capillary density.[13] Besides, hypoxaemia related to anaemia and arterial oxyhaemoglobin desaturation[14, 15] may induce chronic periods of tissular hypoxia which has been reported to ultimately depress muscle oxidative capacity via tumor necrosis factor- α and nuclear factor- κ B cascades.[16, 17] Furthermore, reperfusions subsequent to ischaemia are also known to induce alteration of muscle oxidative phenotype.[16] From these points of view, alterations in muscle energetics can be assumed in patients with sickle cell anaemia. Moreover, ischaemia and tissular anoxia

related to vaso-occlusive crises may potentially lead to tissue necrosis[3] while the pro-inflammatory state[2-5] and oxidative stress[4, 6] related to reperfusion subsequent to ischaemia are also known to induce muscle atrophy[18, 19] and possibly necrosis.[3, 20] Therefore, it remains enigmatic why myonecrosis is not a leading component of sickle crisis.[11]

Because of the lack of knowledge of muscular repercussions of sickle cell anaemia, we studied microvascular, structural, anatomo-pathologic, and energetic characteristics of skeletal muscle in homozygote patients, heterozygote carriers, and control subjects.

METHODS

Participants

Twenty-seven Cameroonian males participated in this study (Table 1) which took place at the General Hospital of Yaoundé (Cameroon). The experiment was approved by the ethics committee (no. 02-06-2007), and conformed to the standards set by the Declaration of Helsinki for human studies. Eligible volunteers were fully informed of the purposes, procedures and possible associated risks and/or discomforts related to the protocol before they gave written informed consent.

*** Insert Table 1 ***

Inclusion protocol

All subjects underwent preliminary screening including a physical examination and a blood phenotype analysis (table 1). Volunteers who 1) had suffered from a malaria episode within the previous two months, 2) had more than three vaso-occlusive crises per year that required hospitalization, 3) took any medications, 4) tested positive for HIV, and/or 5) were taking part in another research program, were not included in the study.

Muscle biopsy

Subjects arrived at the hospital at either 8 am or 12 pm. A muscle biopsy of the right *vastus lateralis* was made.[21] Part of the biopsy sample was mounted in cryomount[®] (Histolab, Göteborg, Sweden), then frozen in isopentan and finally stored in liquid nitrogen until histochemical and immunohistochemical analyses were performed on 10 µm thick cryostat serial transverse sections. The remainder of the sample (frozen and stored in liquid nitrogen) was devoted to enzyme activity analyses.

Microvascular network analysis

Morphometric analysis of microvasculature was performed as done previously.[22] Briefly, capillaries were identified with CD31 antibody (Dako, Glostrup, Denmark) which recognizes platelet endothelial cell adhesion molecule-1, expressed by vascular endothelial cells. Capillary wall thickness was measured on hemalum eosin safran coloration. The presence of smooth muscle myosin heavy chain and fibrous and/or collagenous tissue was determined by immunofluorescence (double staining CD31 and SM-MHC, Abcam, Cambridge, UK) and Van Gieson coloration,[23] respectively.

Muscle characteristics

Fibre type determination, distribution, and morphology have been analysed as previously described.[24] Fibre type was determined on immunohistochemical preparations using anti-fast IIA myosin heavy chain N2.261 (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA) and anti-slow myosin heavy chain A4.951 (Alexis Biochemicals) monoclonal antibodies. The fibre types were designated as I, I-IIa, IIa, IIa-IIx and IIx (previously referred to as IIb by Brooke and Kaiser[25]).[24, 26] Hemalum eosin safran coloration enabled evaluation of common muscle remodelling signs such as necrotic fibres, fibrosis, fat cells, inflammation signs, internalized nuclei, and/or segmented fibres. Major histocompatibility complex-I was also used to look for inflammation.[23] Counts of regenerated fibres and/or neo-fibres, and satellite cells were performed using monoclonal antibody CD 56 (Dako, Glostrup, Denmark).[27]

Enzyme activities

Creatine kinase (CK), phosphofructokinase (PFK), lactate dehydrogenase (LDH), citrate synthase (CS), and β -hydroxy-acyl-CoA-dehydrogenase (β -HAD) activities were measured at

25°C. Cytochrome *c* oxydase (COx) assessment per fibre type was performed as previously described.[24] Optical density for each muscle fiber using SigmaScan Pro software (SPSS Science, Chicago, IL, USA) was determined to measure COx intensity. For each subject, a single value per fibre type was obtained by averaging measurements from ~60 well-identified muscle fibres.

Microscopy and analyses

Muscle sections were viewed and analysed under a light microscope (Leica DM2000, Leica, Heerbrugg, Germany) connected to a digital camera (Leica DFC490, Leica). Pictures were analysed by an investigator blinded to the nature of the samples using SigmaScan Pro 5.0 software (SPSS Science, Chicago, IL).[22, 24]

Statistics

Descriptive statistics are expressed as mean \pm standard error (SE). When the one-way ANOVA revealed an HbS effect (see RESULTS section), Fisher post hoc tests were used to compare the three groups (see RESULTS section and Tables). Differences were considered to be significant for $p < 0.05$ and to represent a tendency for $0.05 \leq p < 0.1$.

RESULTS

Microvascular remodelling

Microvascular parameters are reported in table 2 and figure 1. Sickle cell anaemia was associated with decreased capillary density ($p = 0.0012$) and number of capillaries in contact with a fibre ($p < 0.0001$). The estimated blood volume in the 10 μm slice was unaffected by HbS. This is due to the increase of the capillary surface area in patients ($p = 0.0009$). Capillary tortuosity was lower in sickle cell anaemia ($p < 0.0001$) while the ratio of the contact length between capillary and muscle fibre over the fibre perimeter was not affected. Capillary outer diameter increased strikingly with HbS ($p < 0.0001$), so that percentage (figure 1a) and number (figure 1b) of wide microvessels ($>10 \mu\text{m}$) increased ($p < 0.0001$ for both) while percentage (figure 1a) and number (figure 1b) of narrow capillaries ($<5 \mu\text{m}$) decreased ($p < 0.0001$ and $p = 0.0003$, respectively) in sickle cell trait carriers and further in sickle cell anaemia patients compared to control subjects.

*** Insert Table 2 ***

*** Insert Figure 1 ***

Immunofluorescence [double staining endothelial cells (CD 31) + smooth muscle (SM-MHC)] and histochemical (Van Gieson coloration) analyses did not reveal the presence of either smooth muscle (figure 2a) or fibrous and/or collagenous tissues (figure 2b) around the studied capillaries. Microvessels wall thickness was not different among the three groups, but it tended to be thinner in patients compared to carriers and controls ($p = 0.0813$ and $p = 0.0909$, respectively). The ratio capillary wall thickness over capillary outer diameter decreased as a function of HbS percentage ($p = 0.0003$).

*** Insert Figure 2 ***

Skeletal muscle remodelling

Skeletal muscle structural, anatomic-pathologic, and energetic characteristics are reported in table 3. Percentage of type I fibres increased in patients ($p = 0.0335$) whereas percentages of type IIa and IIa-IIx fibres were lower ($p = 0.0255$ and $p = 0.0482$, respectively). No difference was found among the groups concerning distribution of type I-IIa and IIx fibres. The mean surface areas of type I and IIa fibres decreased in patients ($p = 0.0045$ and $p = 0.0029$, respectively). Mean surface area of type IIx and hybrid (I-IIa and IIa-IIx) fibres did not differ among the groups. Surface area for 100 myocytes (taking into account fibre type distribution) demonstrated a clear amyotrophy in patients ($p = 0.0130$).

In terms of degenerative signs, more inter-fascicular adipocytes were observed in patients ($p = 0.0160$). However, no differences were observed among the three groups in terms of tissue necrosis and inflammatory infiltrate. Concerning regenerative signs, a higher number of internalized nuclei was found in carriers than in patients ($p = 0.0193$) and controls ($p = 0.0110$) with no difference between the two latter groups. A higher number of satellite cells (per 100 muscle fibres) was found with HbS ($p < 0.0001$).

*** Insert Table 3 ***

Creatine kinase ($p = 0.0147$), citrate synthase ($p < 0.0001$), and β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase ($p = 0.0012$) activities were lower in patients. Cytochrome *c* oxidase activity in IIa and IIx fibres tended to be and was lower ($p = 0.0691$ and $p = 0.0291$, respectively) in patients. Phosphofructokinase and lactate dehydrogenase activities were not different among groups.

DISCUSSION

The present study highlighted marked effects of sickle cell anaemia on microvascular, structural, and energetic characteristics of skeletal muscle.

The lower capillary density and number of capillaries in contact with a muscle fibre underline an important rarefaction of the microvascular network within the skeletal muscle of sickle cell anaemia patients. The observed reduction in the microvascular network might be explained by an endothelial apoptosis (caused by lumen obstruction or absence of reflow after resolution of ischaemia[3, 28]) unbalanced by compensatory angiogenic processes. At first sight, lower capillary density and number of capillaries per fibre would suggest collectively disturbances in i) blood supply to muscular tissue and ii) exchange surface area between capillaries and adjacent muscle fibres. Both of them could potentially reduce gas and metabolites supply to (e.g., O₂ and glucose) and release from (e.g., CO₂ and lactate) tissues. However, the functional surface of exchange between a muscle fibre and the adjacent microvessels (LC/PF index) was not different in patients. The maintenance of this functional surface of exchange was mainly explained by lower fibre surface area i.e., an amyotrophy in patients (*vide infra*). Likewise, the estimated blood volume that crosses the muscle section (CD x CSA index)[22] was not different in patients compare to controls. Hence, despite a lower capillary density, muscle blood supply might not be altered in sickle cell anaemia, suggesting that the lower oxygen supply to tissue reported in patients[29, 30] could be attributed to anaemia and arterial oxygen desaturation[15, 31] rather than to impaired local blood supply. This inference is in accordance with previous results showing a reduced microvascular oxygenation in sickle cell anaemia patients while the microvascular blood flow was actually increased in the mentioned study.[30] Besides, mean capillary outer diameter was bigger in patients (8.6 µm), approaching the mean diameter of erythrocytes. This enlargement of microvessels in sickle cell anaemia may facilitate passage of the less

deformable HbS-containing erythrocytes through the capillary network,[32] dampening the risks of their entrapment in the microvasculature,[33] and reducing (but not annihilating) the associated local blood flow disorders.[34] Furthermore, wider microvessels may contribute to reduce plasma skimming, improve capillary recruitment by erythrocytes, and to ameliorate oxygen supply to tissues. Moreover, the lower capillary tortuosity observed in sickle cell anaemia patients may, by shortening erythrocytes transit time in the microvasculature, also contribute to smooth local blood flow disorders in sickle cell anaemia. This apparent protective mechanism against blood flow disorders mediated by wider capillaries and a decreased capillary tortuosity may at least to some extent explain the fact that myonecrosis is not a leading component of sickle crisis.[9] These particular adaptations of the microvasculature may be attributed to either 1) a regression of the narrowest microvessels, 2) an arterialization of some capillaries, 3) a thickening of the capillary wall of the existing microvessels, 4) an enlargement of their lumen, 5) a neovascularization, 6) a bridging of the stenosis area with bypasses which are enlarged collateral blood vessels, or 7) a combination of all aforementioned possibilities.[35] Several results of the present study are informative regarding these different possibilities. Figures 1a and 1b show clearly that both percentage and number of the narrowest ($<5\ \mu\text{m}$) and widest ($>10\ \mu\text{m}$) microvessels were, respectively, lower and higher in sickle cell anaemia, suggesting a regression of the narrowest microvessels. Besides, we tested the presence of smooth muscle and fibrous and/or collagenous tissues around the observed microvessels and both staining were negative (Fig. 2a,b). These latter results exclude the hypothesis that the observed microvessels were terminal arterioles or primary venules, but they support the fact that enlarged capillaries were observed. Because capillary wall thickness was not different among the three groups, the wider size of the capillaries can therefore be attributed to an enlargement of the lumen. Finally, the lower ratio of capillary wall thickness over outer diameter observed with HbS

testified of a distension of the capillaries in sickle cell anaemia (Table 2). Whether this distension can be related to a decrease in peripheral resistances and to the lower arterial blood pressure observed in sickle cell anaemia[36-38] remains to be investigated. Taken together, the absence of smooth muscle and fibrous and/or collagenous tissues, the lack of capillary wall thickening and the distension of the capillaries argue in favour of a weakening of the capillary structure in sickle cell anaemia. It could be tempting to approach these apparent distension and fragility of the microvessels to the haemorrhagic cerebrovascular accidents occurring without aneurysms observed in SCA patients.[8, 39, 40] It is also interesting to note that the severity of the microvascular remodelling was closely associated with HbS proportion. Indeed, although considered asymptomatic, carriers of sickle cell trait display a significant microvascular remodelling, which was intermediary to the ones observed in control subjects and patients with sickle cell anaemia.

The 30% smaller type I and IIa fibre surface areas along with the lower mean surface area covered by 100 myocytes (taking into account fibre type distribution) clearly demonstrate a significant amyotrophy in patients compared to carriers and controls. Besides, while carriers and controls displayed concordant muscle fibre type distribution with those reported in other African populations,[24, 41] patients exhibited a higher proportion of type I and a lower proportion of type IIa muscle fibres (Table 3). This particular muscle fibre type distribution seems to suggest a disappearance of type IIa and a relative maintenance of type I muscle fibres (Table 3). The low physical activity and energy expenditure of patients with sickle cell anaemia during their everyday life may not require type II muscle fibres recruitment, but it involves mainly type I muscle fibres that might help maintenance of this latter muscle fibre type. The general amyotrophy is concordant with the repeated, sometimes silent and/or subclinical muscle vaso-occlusions and ischaemia-reperfusion periods experienced by sickle cell anaemia patients[2, 5, 42] which are known to induce skeletal

muscle dysfunction and eventually tissue necrosis.[3] Several other signs also testified of a significant muscle remodelling in patients with sickle cell anaemia. Four out of the seven patients displayed intercellular adipocytes, which is a sign of muscle degeneration[23] that reinforces the hypothesis of muscle wasting reported above. Besides, the higher number of satellite cells in patients and carriers (proportionally to HbS content) suggests a proliferation of those cells, and an activation of the regenerative processes[27] that might be interpreted as an attempt of myocytes to counteract muscle wasting. However, nuclei internalization and segmented fibres, other witnesses of actual regeneration,[23] were higher in carriers and not significantly upregulated in patients. In the aggregate, the present results seem to indicate that if regeneration was activated in carriers and patients, this process did not seem to occur effectively in patients. This might at least partly explain why a muscle wasting appeared in patients and not in carriers. In other words, if the amyotrophy observed in sickle cell anaemia patients can be partly related to their physical hypoactivity,[10, 43] a default in muscle regeneration cannot be totally excluded. No fibrosis and no signs of inflammation, such as lymphocytes, macrophages, or fibres expressing major histocompatibility complex-I were observed in patients, that is not divergent from previous studies having observed myonecrosis secondary to sickle crises with minimal inflammatory reaction.[9, 11]

Analysis of key enzyme activities of energetic metabolism revealed decreased β -hydroxylacyl-CoA dehydrogenase and citrate synthase activities in patients with sickle cell anaemia. Because these enzymes are good markers of fatty acid oxidation and Krebs cycle, their lower activities depict an overall impairment of muscle oxidative capacity. This was confirmed by the decreased cytochrome *c* oxidase activity obtained in type IIa and IIx fibres. The fact that activity of this latter enzyme was maintained in type I fibres was reminiscent of our above-mentioned results concerning muscle fibre type distribution and surface areas, and further argues in favour of the inference that type I fibres were less affected in sickle cell

anaemia than any other muscle fibre types. Muscle creatine kinase activity was also reduced in patients. Because muscle creatine kinase and cytochrome *c* oxidase activities have been showed to be depressed by reactive oxygen species,[44, 45] an oxidative stress (well-known in the vascular bed,[34] but unknown in the muscle compartment) might be suspected in skeletal muscle of patients with sickle cell anaemia. However, this hypothesis remains to be tested.

Together, amyotrophy and altered oxidative capacity may explain poor muscle function, impaired exercise tolerance, and consequently the low quality of life reported in patients with sickle cell anaemia.[46, 47]

CONCLUSIONS

In summary, the present study highlighted for the first time a profound remodelling of microvascular, structural, and energetic characteristics of skeletal muscle in patients with sickle cell anaemia and to a lesser extent in sickle cell trait carriers. The microvascular remodelling included microvessels rarefaction, lower capillaries tortuosity, and striking lumen enlargement. However, no reinforcement of the capillary wall was apparent. This remodelling seems to contribute to limit the risk of entrapment of red blood cells into the microvasculature, and to maintain local blood, but weakens capillaries. The muscle remodelling included a significant amyotrophy, a possible muscular wasting affecting mainly type II muscle fibres and a marked decrease in muscle oxidative capacity, contributing to the poor exercise tolerance and low quality of life of patients with sickle cell anaemia.

Acknowledgements The authors thank Marie-Pierre Blanc, Amandine Delet, Anne Gourounas, Dominique Gouttefangeas (Université de Lyon, Laboratoire de Physiologie de l'Exercice EA4338, Saint Etienne, France), Jean-Pierre Lamarque, François-Xavier Owona, Philippe Stoff and Patrice Thiriet for their helpful technical assistance. The logistic supports offered by the Institut National de la Jeunesse et des Sports of Yaoundé, the Ministry of Higher Education of Cameroon, the Embassy of France in Cameroon and Les Brasseries du Cameroun are also recognized.

Contributors MR did the literature search, designed the figures, did the statistical analyses, collected, analysed and interpreted the data, and wrote and reviewed the manuscript. She is guarantor. LF conceived and designed the study, did the literature search, collected, analysed and interpreted the data, and wrote and reviewed the manuscript. He is guarantor. SO-E, BD and CE conceived and designed the study, collected the data, and wrote and reviewed the manuscript. LV did the literature search, collected, analysed and interpreted the data, and wrote and reviewed the manuscript. LM conceived and designed the study, did the literature search, collected, analysed and interpreted the data, and wrote and reviewed the manuscript. He is guarantor.

Funding This study was supported by grants from the Embassy of France in Cameroon (accommodations), the Région Rhône-Alpes (reagents), and the Ministry of Higher Education of Cameroon (blood screening of subjects and patients). All authors are independent of funders.

Competing interests None.

Transparency declaration: The manuscript is an honest, accurate, and transparent account of the study being reported; no important aspects of the study have been omitted.

Data sharing statement No additional data are available.

REFERENCES

1. Serjeant G. *Sickle Cell Disease*. Second Edition ed: Oxford University press, 1992.
2. Nath KA, Grande JP, Croatt AJ, et al. Transgenic sickle mice are markedly sensitive to renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 2005;**166**(4):963-72 doi: S0002-9440(10)62318-8 [pii]
10.1016/S0002-9440(10)62318-8[published Online First: Epub Date]].
3. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1998;**179**(1-2):169-87
4. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000;**190**(3):255-66 doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<255::AID-PATH526>3.0.CO;2-6 [pii]
10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<255::AID-PATH526>3.0.CO;2-6[published Online First: Epub Date]].
5. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med* 2011;**17**(11):1391-401 doi: nm.2507 [pii]
10.1038/nm.2507[published Online First: Epub Date]].
6. Chirico EN, Pialoux V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB life* 2012;**64**(1):72-80 doi: 10.1002/iub.584[published Online First: Epub Date]].
7. Gladwin MT, Sachdev V. Cardiovascular abnormalities in sickle cell disease. *J Am Coll Cardiol* 2012;**59**(13):1123-33 doi: 10.1016/j.jacc.2011.10.900[published Online First: Epub Date]].
8. Vicari P, Choairy AC, Siufi GC, Arantes AM, Fonseca JR, Figueiredo MS. Embolization of intracranial aneurysms and sickle cell disease. *Am J Hematol* 2004;**76**(1):83-4 doi: 10.1002/ajh.20033[published Online First: Epub Date]].
9. Valeriano-Marcet J, Kerr LD. Myonecrosis and myofibrosis as complications of sickle cell anemia. *Ann Intern Med* 1991;**115**(2):99-101
10. Schumacher HR, Jr., Murray WM, Dalinka MK. Acute muscle injury complicating sickle cell crisis. *Seminars in arthritis and rheumatism* 1990;**19**(4):243-7
11. Mani S, Duffy TP. Sickle myonecrosis revisited. *Am J Med* 1993;**95**(5):525-30
12. Malekgoudarzi B, Feffer S. Myonecrosis in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1999;**340**(6):483 doi: 10.1056/NEJM199902113400615[published Online First: Epub Date]].
13. Kawada S, Ishii N. Changes in skeletal muscle size, fibre-type composition and capillary supply after chronic venous occlusion in rats. *Acta Physiol (Oxf)* 2008;**192**(4):541-9 doi: APS1761 [pii]
10.1111/j.1748-1716.2007.01761.x[published Online First: Epub Date]].
14. Setty BN, Stuart MJ, Dampier C, Brodecki D, Allen JL. Hypoxaemia in sickle cell disease: biomarker modulation and relevance to pathophysiology. *Lancet* 2003;**362**(9394):1450-5 doi: S0140-6736(03)14689-2 [pii]
10.1016/S0140-6736(03)14689-2[published Online First: Epub Date]].
15. Quinn CT, Sargent JW. Daytime steady-state haemoglobin desaturation is a risk factor for overt stroke in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 2008;**140**(3):336-9 doi: BJH6927 [pii]
10.1111/j.1365-2141.2007.06927.x[published Online First: Epub Date]].
16. Remels AH, Gosker HR, Schrauwen P, et al. TNF-alpha impairs regulation of muscle oxidative phenotype: implications for cachexia? *FASEB J* 2010;**24**(12):5052-62 doi: fj.09-150714 [pii]
10.1096/fj.09-150714[published Online First: Epub Date]].

17. de Theije C, Costes F, Langen RC, Pison C, Gosker HR. Hypoxia and muscle maintenance regulation: implications for chronic respiratory disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011;**14**(6):548-53 doi: 10.1097/MCO.0b013e32834b6e79[published Online First: Epub Date]].
18. Kondo H, Miura M, Itokawa Y. Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta Physiol Scand* 1991;**142**(4):527-8
19. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 2008;**88**(4):1243-76 doi: 88/4/1243 [pii] 10.1152/physrev.00031.2007[published Online First: Epub Date]].
20. Ejindu VC, Hine AL, Mashayekhi M, Shorvon PJ, Misra RR. Musculoskeletal manifestations of sickle cell disease. *Radiographics* 2007;**27**(4):1005-21 doi: 27/4/1005 [pii] 10.1148/rg.274065142[published Online First: Epub Date]].
21. Feasson L, Stockholm D, Freyssenet D, et al. Molecular adaptations of neuromuscular disease-associated proteins in response to eccentric exercise in human skeletal muscle. *J Physiol* 2002;**543**(Pt 1):297-306
22. Vincent L, Feasson L, Oyono-Enguelle S, et al. Remodeling of skeletal muscle microvasculature in sickle cell trait and alpha-thalassemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;**298**(2):H375-84 doi: 00812.2009 [pii] 10.1152/ajpheart.00812.2009[published Online First: Epub Date]].
23. Dubowitz V, Sewry, CA. *Muscle Biopsy A practical Approach*, 2007.
24. Vincent L, Feasson L, Oyono-Enguelle S, et al. Skeletal muscle structural and energetic characteristics in subjects with sickle cell trait, alpha-thalassemia, or dual hemoglobinopathy. *J Appl Physiol* 2010;**109**(3):728-34 doi: japplphysiol.00349.2010 [pii] 10.1152/japplphysiol.00349.2010[published Online First: Epub Date]].
25. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 1970;**23**(4):369-79
26. Verney J, Kadi F, Charifi N, et al. Effects of combined lower body endurance and upper body resistance training on the satellite cell pool in elderly subjects. *Muscle Nerve* 2008;**38**(3):1147-54 doi: 10.1002/mus.21054[published Online First: Epub Date]].
27. Kadi F, Schjerling P, Andersen LL, et al. The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *The Journal of physiology* 2004;**558**(Pt 3):1005-12
28. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;**6**(4):389-95 doi: 10.1038/74651[published Online First: Epub Date]].
29. Nahavandi M, Tavakkoli F, Hasan SP, Wyche MQ, Castro O. Cerebral oximetry in patients with sickle cell disease. *Eur J Clin Invest* 2004;**34**(2):143-8 doi: 1307 [pii][published Online First: Epub Date]].
30. Waltz X, Pichon A, Lemonne N, et al. Normal muscle oxygen consumption and fatigability in sickle cell patients despite reduced microvascular oxygenation and hemorheological abnormalities. *PLoS One* 2012;**7**(12):e52471 doi: 10.1371/journal.pone.0052471[published Online First: Epub Date]].
31. Quinn CT, Variste J, Dowling MM. Haemoglobin oxygen saturation is a determinant of cerebral artery blood flow velocity in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 2009;**145**(4):500-5 doi: BJH7652 [pii] 10.1111/j.1365-2141.2009.07652.x[published Online First: Epub Date]].

32. Parthasarathi K, Lipowsky HH. Capillary recruitment in response to tissue hypoxia and its dependence on red blood cell deformability. *Am J Physiol* 1999;**277**(6 Pt 2):H2145-57
33. Simchon S, Jan KM, Chien S. Influence of reduced red cell deformability on regional blood flow. *Am J Physiol* 1987;**253**(4 Pt 2):H898-903
34. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* 2010;**376**(9757):2018-31 doi: S0140-6736(10)61029-X [pii] 10.1016/S0140-6736(10)61029-X[published Online First: Epub Date]].
35. Hudlicka O, Brown M, Egginton S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev* 1992;**72**(2):369-417
36. Grell GA, Alleyne GA, Serjeant GR. Blood pressure in adults with homozygous sickle cell disease. *Lancet* 1981;**2**(8256):1166
37. Homi J, Homi-Levee L, Gentles S, Thomas P, Serjeant G. Adolescent blood pressure in a cohort study of sickle cell disease. *Arch Intern Med* 1993;**153**(10):1233-6
38. Pegelow CH, Colangelo L, Steinberg M, et al. Natural history of blood pressure in sickle cell disease: risks for stroke and death associated with relative hypertension in sickle cell anemia. *Am J Med* 1997;**102**(2):171-7 doi: S000293439600407X [pii][published Online First: Epub Date]].
39. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood* 1998;**91**(1):288-94
40. Powars D, Wilson B, Imbus C, Pegelow C, Allen J. The natural history of stroke in sickle cell disease. *Am J Med* 1978;**65**(3):461-71 doi: 0002-9343(78)90772-6 [pii][published Online First: Epub Date]].
41. Ama PF, Simoneau JA, Boulay MR, Serresse O, Theriault G, Bouchard C. Skeletal muscle characteristics in sedentary black and Caucasian males. *J Appl Physiol* 1986;**61**(5):1758-61
42. Wallace KL, Marshall MA, Ramos SI, et al. NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN-gamma and CXCR3 chemokines. *Blood* 2009;**114**(3):667-76 doi: 10.1182/blood-2009-02-205492[published Online First: Epub Date]].
43. Buchowski MS, Townsend KM, Williams R, Chen KY. Patterns and energy expenditure of free-living physical activity in adolescents with sickle cell anemia. *J Pediatr* 2002;**140**(1):86-92 doi: S0022-3476(02)85460-9 [pii] 10.1067/mpd.2002.120689[published Online First: Epub Date]].
44. Di Giovanni S, Mirabella M, Papacci M, Odoardi F, Silvestri G, Servidei S. Apoptosis and ROS detoxification enzymes correlate with cytochrome c oxidase deficiency in mitochondrial encephalomyopathies. *Mol Cell Neurosci* 2001;**17**(4):696-705 doi: 10.1006/mcne.2001.0970 S1044-7431(01)90970-4 [pii][published Online First: Epub Date]].
45. Genet S, Kale RK, Baquer NZ. Effects of free radicals on cytosolic creatine kinase activities and protection by antioxidant enzymes and sulfhydryl compounds. *Molecular and cellular biochemistry* 2000;**210**(1-2):23-8
46. Callahan LA, Woods KF, Mensah GA, Ramsey LT, Barbeau P, Gutin B. Cardiopulmonary responses to exercise in women with sickle cell anemia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;**165**(9):1309-16
47. Machado RF, Mack AK, Martyr S, et al. Severity of pulmonary hypertension during vaso-occlusive pain crisis and exercise in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol* 2007;**136**(2):319-25 doi: BJH6417 [pii] 10.1111/j.1365-2141.2006.06417.x[published Online First: Epub Date]].

Figure legends

Figure 1 Capillary Outer Diameter (COD, μm).

(a) Percentage of capillaries with COD $<5\mu\text{m}$, $5-10\mu\text{m}$ and $>10\mu\text{m}$. (b) Number of capillaries with COD $<5\mu\text{m}$, $5-10\mu\text{m}$ and $>10\mu\text{m}$.

CON: controls, SCT: sickle cell trait carriers, SCA: patients with sickle cell anaemia.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Figure 2 Structure of capillary walls.

(a) Double immunofluorescence staining, showing capillaries (CD31) in green and smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC) in red. (b) Van Gieson coloration, showing fibrous and collagenous tissues. Scale bars = $25\ \mu\text{m}$. Arrowheads show capillaries.

CON: controls, SCA: patients with sickle cell anaemia.

Table 1 Anthropometric, Haemoglobinic and Haematologic data of the participants.

	CON n=10	SCT n=10	SCA n=7
Anthropometric data			
Age	25 ± 1	23 ± 1	24 ± 2
Height (cm)	176 ± 2	176 ± 1	171 ± 3
Body mass (kg)	72 ± 2	68 ± 2	59 ± 3 *** #
Body Fat (%)	13 ± 1	11 ± 1 #	11 ± 1 †
BMI (kg/m ²)	23.1 ± 0.6	21.9 ± 0.4	20.6 ± 0.8 **
Haemoglobinic and Haematologic data			
HbS (%)	na	31.65 ± 1.89 ***	80.90 ± 2.02 *** ###
HbF (%)	nm	0.08 ± 0.08	4.63 ± 1.36 *** ###
Hb (g/dl)	14.1 ± 0.3	13.4 ± 0.3	8.8 ± 0.6 *** ###
Hct (%)	41.1 ± 0.8	39.8 ± 0.6	25.2 ± 1.9 *** ###

Values are mean ± SE. CON: controls, SCT: sickle cell trait carriers, SCA: patients with sickle cell anaemia. n: number of subjects; HbA1: haemoglobin A1; HbF: fetal haemoglobin; Hb: haemoglobin total; Hct: haematocrit; MCH: mean corpuscular haemoglobin. † different from CON with $0.05 \leq p < 0.1$, ** different from CON with $p < 0.01$, *** different from CON with $p < 0.001$, # different from SCT with $p < 0.05$, ## different from SCT with $p < 0.01$, ### different from SCT with $p < 0.001$. na: not applicable, nm: not measured.

Table 2 Microvascular remodelling.

	CON n=10	SCT n=10	SCA n=7
Capillary density (cap/mm²)	343.5 ± 13.1	327.2 ± 8.1	278.7 ± 7.5 *** ##
Number of capillaries per fibre	4.68 ± 0.21	4.15 ± 0.22	2.53 ± 0.11 *** ###
Capillary surface area (µm²)	45.6 ± 2.5	43.2 ± 1.8	65.4 ± 7.0 ** ###
CD x CSA	15,573 ± 878	13,897 ± 616	18,010 ± 1,590 ##
Capillary tortuosity	2.77 ± 0.15	1.87 ± 0.07 ***	1.57 ± 0.10 *** \$
LC/PF (%)	14.49 ± 0.82	13.50 ± 0.86	15.88 ± 0.76 †
Capillary outer diameter (µm)	4.9 ± 0.1	6.0 ± 0.2 **	8.6 ± 0.6 *** ###
Capillary wall thickness (µm)	0.50 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.44 ± 0.03 † \$
Capillary wall thickness/COD	0.119 ± 0.010	0.092 ± 0.006 *	0.061 ± 0.007 *** #

Values are mean ± SE. CON: controls, SCT: sickle cell trait carriers, SCA: patients with sickle cell anaemia. n: number of subjects. CD x CSA: estimated instantaneous blood volume in the 10 µm thick slice, LC/PF: estimated the functional surface of exchange, length of capillaries in contact with a fibre/perimeter of the fibre (%). * different from CON with $p < 0.05$, \$ different from SCT with $0.05 \leq p < 0.1$. Other symbols: see table 1.

Table 3 Muscle structural, pathophysiological and energetic characteristics.

	CON n=10	SCT n=10	SCA n=7
Structural remodelling: Fibre type distribution and surface area			
% Type I	33.5 ± 1.5	34.5 ± 2.5	43.6 ± 4.0 * #
% Type I-IIa	0.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.6 ± 1.0 #
% Type IIa	45.6 ± 2.4	45.6 ± 2.8	35.4 ± 2.5 * #
% Type IIa-IIx	13.1 ± 2.2	8.8 ± 1.4 †	6.3 ± 1.4 *
% Type IIx	7.1 ± 2.1	11.1 ± 2.8	13.0 ± 3.7
Surface area Type I (µm ²)	4,951 ± 225	4,429 ± 350	3,193 ± 414 ** #
Surface area Type I-IIa (µm ²)	4,207 ± 683	3,879 ± 210	3,048 ± 149
Surface area Type IIa (µm ²)	4,957 ± 283	5,038 ± 347	3,398 ± 271 ** ##
Surface area Type IIa-IIx (µm ²)	3,937 ± 261	4,096 ± 470	3,261 ± 322
Surface area Type IIx(µm ²)	3,825 ± 474	3,924 ± 461	2,956 ± 263
Surface area for 100 myocytes (mm ²)	452 ± 45	462 ± 30	302 ± 23 ** ##
Structural remodelling: Degenerative signs			
Necrotic fibres	0	0	0
Lymphocytes, Macrophages, MHC-I	0	0	0
Adipocytes	10 (1)	10 (1)	57 (4)
Fibrosis	0	10 (1)	0
Structural remodelling: Regenerative signs			
Subjects with segmented fibres (%)	20 (2)	50 (5)	29 (2)
Nuclei internalization (% myocytes)	2.1 ± 0.6	5.0 ± 0.9 *	2.1 ± 0.8 #
Fibres CD56+ (% myocytes)	1.6 ± 0.8	1.3 ± 0.4	2.7 ± 0.9
Satellite cells (% myocytes)	3.3 ± 0.5	5.2 ± 0.4**	7.5 ± 0.2 *** ##
Enzyme activities			
CK	1,822 ± 36	1,773 ± 50	1,568 ± 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 *

Values are % of subjects showing histologic signs (*number of subjects*) or mean ± SE. CON:

controls, SCT: sickle cell trait carriers, SCA: patients with sickle cell anaemia. n: number of

subjects. For enzyme activities, values are expressed for all activities as µmol·min⁻¹·g⁻¹ dry

muscle except for COx activity expressed in arbitrary unit (AU). CK: creatine kinase, PFK: phosphofructokinase, LDH: lactate dehydrogenase, CS: citrate synthase, β -HAD: β -hydroxylacyl-CoA dehydrogenase, COx: cytochrome *c* oxidase. Symbols: see tables 1 and 2.

Figures

Figure 1

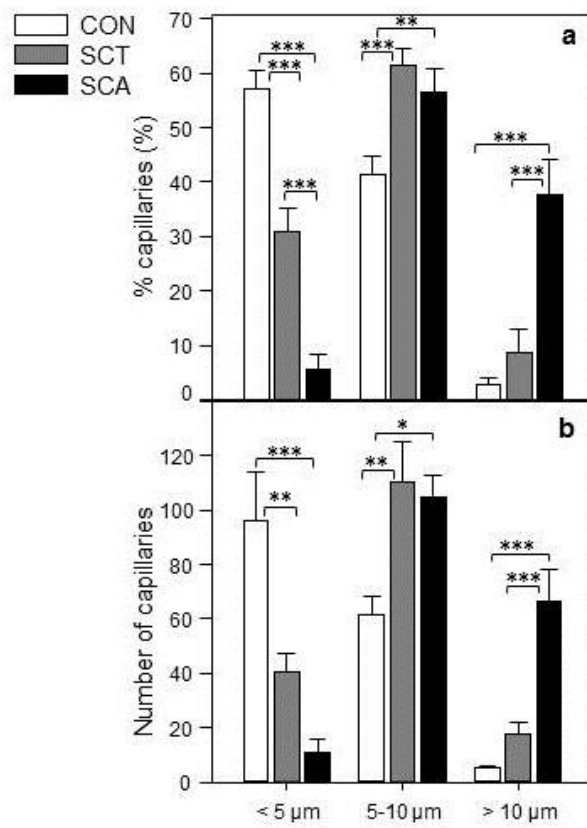
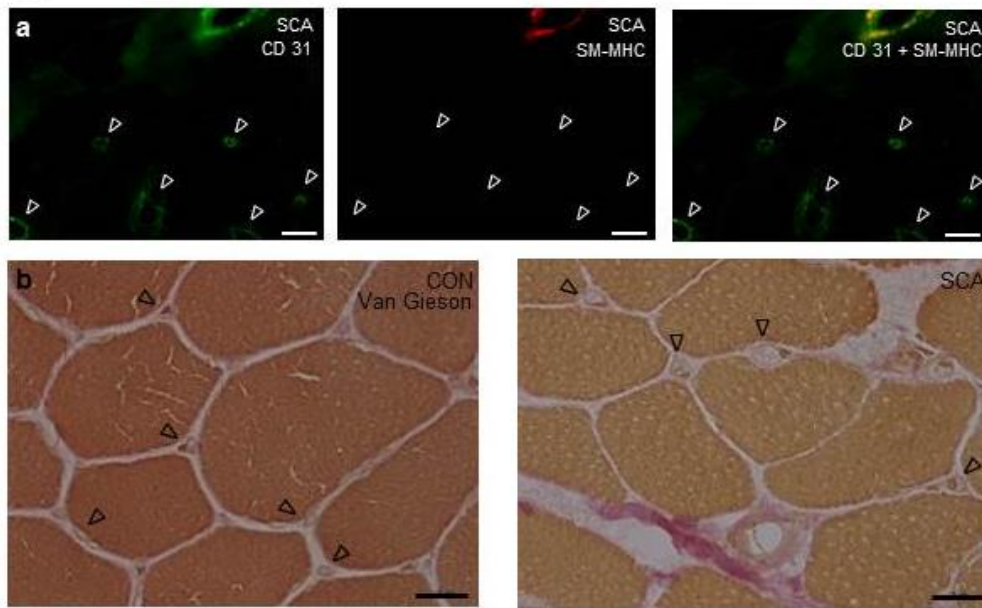


Figure 2



III. Discussion et Conclusion

Cette étude a mis en évidence pour la première fois un remodelage microvasculaire, structural et énergétique sur le tissu musculaire des hommes drépanocytaires.

III.1. Donnée anthropométriques, hématologiques et hémoglobiniques

La population étudiée est relativement homogène car les sujets sont tous étudiants à l'Université de Yaoundé, Cameroun et vivent dans un même contexte socio-économique. En particulier leur âge et leur taille ne diffèrent pas entre les trois groupes CON, SCT et SCA. En revanche, le poids et l'IMC des sujets drépanocytaires sont significativement plus réduits par rapport à ceux des deux autres groupes. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui rapporte des conséquences de la drépanocytose sur la croissance staturo-pondérale (Ashcroft *et al.*, 1972). Cependant, le poids plus léger des drépanocytaires pourrait également relever d'une sédentarité plus importante que chez les sujets contrôles. Ce qui pourrait alors être interprété comme une réduction de la masse musculaire.

Les analyses hématologiques confirment le statut hémoglobinique de chacun des 27 sujets de notre étude. Les données du groupe homozygotes à la maladie confirment le caractère hémolytique de l'anémie chronique liée à la drépanocytose comme en témoigne le taux d'hémoglobine, le taux d'hématocrite et le nombre d'érythrocytes très effondrés chez ces sujets. Alors que les deux autres groupes présentent des valeurs normales. Le taux d'hémoglobine S chez les 7 sujets drépanocytaires est homogène, aux alentours de 81%.

Ces différentes données anthropométriques et hématologiques montrent que notre population étudiée est représentative des données recueillies dans la littérature, ce qui nous permet de proposer des interprétations quant aux résultats de nos analyses histologiques témoignant de remodelages microvasculaire et musculaire et de modifications du métabolisme énergétique.

III.2. Remodelage microvasculaire

En présence d'hémoglobine S, le réseau microvasculaire musculaire de la population SCT et SCA a subi un profond remodelage. Celui-ci est caractérisé par une diminution de la densité capillaire, une diminution de la tortuosité des microvaisseaux, et une augmentation du diamètre de ces derniers. Ce remodelage pourrait relever d'une adaptation permettant de

maintenir la surface d'échange théorique dans le muscle, tout en diminuant l'enclavement des hématies falciformées dans les microvaisseaux et donc permettant de moins laisser la place aux crises vaso-occlusives.

La diminution de la densité capillaire et du nombre de capillaires en contact avec une fibre musculaire (indice CAF) témoigne d'une importante raréfaction du réseau microvasculaire du muscle strié squelettique des patients drépanocytaires. Ce moindre réseau microvasculaire pourrait s'expliquer par une apoptose endothéliale, causée par une obstruction de la lumière vasculaire ou par l'absence de reperfusion après un épisode ischémique (Gute *et al.*, 1998, Carmeliet, 2000) et qui ne serait pas atténué par des mécanismes angiogéniques compensatoires.

Ainsi, la moindre densité capillaire et la réduction de CAF pourrait suggérer des perturbations à la fois au niveau de l'approvisionnement sanguin au niveau du muscle et au niveau de la surface d'échange entre les capillaires et les fibres musculaires adjacentes. Ceci pourrait potentiellement réduire les échanges en gaz et en métabolites du sang vers le muscle (O_2 et glucose) et inversement (CO_2 et lactate). Cependant, la surface d'échange fonctionnelle entre une fibre musculaire et les capillaires au contact ne semble pas altérée chez les sujets SCA. Ce maintien de la surface d'échange fonctionnelle s'explique essentiellement par une réduction de la surface de l'ensemble des fibres chez les sujets drépanocytaires (*vide infra*). De même, on n'a pas observé d'altération de l'estimation du volume sanguin (Vincent *et al.*, 2010a) chez les drépanocytaires par rapport aux sujets contrôles. Ainsi, malgré une diminution de la densité capillaire, l'approvisionnement sanguin musculaire semble maintenu chez les sujets SCA ce qui suggère que la diminution de l'apport en O_2 aux tissus observée chez les patients drépanocytaires (Nahavandi *et al.*, 2004, Waltz *et al.*, 2012b) pourrait plutôt être attribuée à l'anémie et à la désaturation artérielle en O_2 (Quinn et Sargent, 2008, Quinn *et al.*, 2009) plutôt qu'à une altération de l'apport sanguin local.

Par ailleurs, le diamètre des capillaires (COD) est plus grand chez les sujets SCA (8,6 μm), se rapprochant du diamètre moyen des globules rouges. Cet élargissement des microvaisseaux observé chez les drépanocytaires pourrait faciliter le passage des hématies contenant de l'HbS dans le réseau capillaire. Etant moins déformables, cela pourrait amoindrir les risques d'enclavement des hématies falciformes dans les microvaisseaux et réduire, sans pour autant les supprimer, les perturbations du débit sanguin (Rees *et al.*, 2010). De plus, cette augmentation du COD pourrait également contribuer à limiter le phénomène de « plasma skimming » et améliorer à la fois le recrutement des capillaires par les globules rouges et l'approvisionnement en O_2 aux tissus.

En outre, la moindre tortuosité capillaire observée chez les sujets drépanocytaires pourrait également, en réduisant le temps de transit des globules rouges dans le réseau microvasculaire, contribuer à atténuer les désordres de la circulation sanguine locale, rencontrés dans la drépanocytose. Ainsi, ce mécanisme protecteur contre les perturbations hémorhéologiques assuré par un élargissement des capillaires et une moindre tortuosité capillaire pourrait au moins en partie expliquer le fait que la myonécrose n'est pas un élément majeur des crises drépanocytaires (Mani et Duffy, 1993).

Ces adaptations particulières du réseau microvasculaire dans le muscle squelettique des sujets drépanocytaires pourraient être le résultat soit 1) d'une régression des microvaisseaux les plus étroits, 2) d'un processus d'artérialisation de certains capillaires, 3), d'un épaissement de la paroi capillaire des microvaisseaux préexistants, 4) un élargissement de leur lumière vasculaire, 5) une néo-vascularisation, 6) de la création de réseau de suppléance d'une zone sténosée avec élargissement des vaisseaux collatéraux, ou 7) une combinaison de toutes ces possibilités mentionnées ci-dessus (Hudlicka *et al.*, 1992). Plusieurs résultats de cette étude témoignent de certaines de ces possibilités d'adaptations. En effet, les figures 1A et 1B de l'article montrent clairement une réduction du pourcentage et du nombre de microvaisseaux de plus petits diamètres ($> 5 \mu\text{m}$) chez les sujets SCA, alors qu'on observe une augmentation du nombre de microvaisseaux de plus grands diamètres ($< 10 \mu\text{m}$). Cette observation suggère donc une régression des plus petits microvaisseaux et un relatif maintien du nombre des plus grands. Par ailleurs, nous avons recherché la présence de cellules musculaires lisses et de tissu fibreux et/ou collagénique dans et autour de la paroi capillaire mais ces deux colorations sont demeurées négatives (Figures 2A et 2B de l'article). Ces résultats nous permettent d'exclure l'hypothèse que les microvaisseaux observés puissent être des artérioles ou veinules, mais supportent bien le fait que ce sont plutôt des capillaires distendus. L'épaisseur de la paroi capillaire n'étant pas différente entre les trois groupes de sujets, l'augmentation du diamètre des capillaires peut effectivement être attribuée à un élargissement de la lumière capillaire. Par ailleurs, la réduction du rapport de l'épaisseur de la paroi capillaire sur le COD observée en présence d'hémoglobine S renforce l'hypothèse de cette distension des capillaires dans la drépanocytose (Tableau 2 de l'article). De ce fait, en absence de cellules musculaires lisses et de tissus fibreux et/ou collagéniques, l'augmentation du diamètre des microvaisseaux ne relève pas d'un processus d'artériolisation ou de renforcement de paroi, mais révèle un phénomène de distension des capillaires qui augmentent leur diamètre *via* l'augmentation de leur lumière vasculaire, témoignant en faveur d'une fragilité microvasculaire. Ainsi, cette fragilisation potentielle du réseau microvasculaire

dans le muscle ne manque pas de faire penser aux accidents vasculaires cérébraux hémorragiques sans rupture d'anévrisme rencontrés chez les sujets SCA (Powars *et al.*, 1978, Ohene-Frempong *et al.*, 1998, Vicari *et al.*, 2004).

De plus, il paraît intéressant de noter que ce remodelage microvasculaire est associé à la proportion d'hémoglobine S. En effet, les caractéristiques microvasculaires des sujets SCT, observées dans cette étude et dans celle réalisée auparavant par notre équipe (Vincent *et al.*, 2010a), sont intermédiaires entre les sujets contrôles et les sujets homozygotes à la maladie. La sévérité du remodelage microvasculaire semble donc dépendre du taux d'hémoglobine S circulant.

III.3. Remodelage structural

La réduction d'environ 30% de la surface des fibres de type I et IIa, qui représentent environ 80% de l'ensemble des myocytes, ainsi que la réduction d'environ 38% de la surface occupée par 100 myocytes en prenant en compte la distribution par type des fibres, démontrent une nette amyotrophie chez les sujets drépanocytaires par rapport aux sujets contrôles. Si on s'accorde pour dire qu'il s'agit d'un reflet pertinent de la masse maigre, ces données suggèrent que la réduction de l'IMC de 11% observée chez les sujets SCA par rapport aux sujets contrôles, se fait en grande partie au dépend de la masse maigre.

Par ailleurs, alors que les sujets hétérozygotes et contrôles présentent une distribution des différents types de fibres comparable à celle reportée dans d'autres populations africaines (Ama *et al.*, 1986, Vincent *et al.*, 2010b), les sujets SCA affichent une diminution des fibres de type IIa et une augmentation des fibres de type I (Tableau 3 de l'article). Cette typologie particulière, spécifique aux sujets SCA suggère une disparation des fibres de type IIa et un maintien relatif des fibres de type I. Comme les sujets drépanocytaires ont une activité physique journalières restreinte et donc une faible demande énergétique (Buchowski *et al.*, 2002), ils pourraient ainsi avoir un besoin plus limité de recrutement des fibres « rapides » notamment de type IIa alors que les fibres de type I resteraient logiquement impliquées, ce qui pourrait expliquer le relatif maintien de ce dernier type de fibres. L'amyotrophie observée chez les sujets SCA pourrait être une des conséquences des crises vaso-occlusives silencieuses et/ou infraclinique et des épisodes d'ischémie-reperfusion que subissent ces patients (Nath *et al.*, 2005, Wallace *et al.*, 2009, Eltzschig et Eckle, 2011) en induisant des complications musculaires insidieuses et plus rarement des épisodes de nécrose tissulaire (Gute *et al.*, 1998).

De plus, d'autres signes témoignent également d'un remodelage musculaire chez les sujets drépanocytaires. En effet, quatre SCA sur sept présentent une adipocyté intercellulaire, ce qui est un signe de dégénérescence musculaire classiquement rencontré dans des maladies musculaires chroniques (Dubowitz, 2007) et qui renforce l'hypothèse de la perte de masse musculaire reportée ci-dessus. Par ailleurs, l'augmentation du nombre de cellules satellites chez les sujets hétérozygotes et homozygotes à la maladie (en proportion au taux d'HbS) suggère une prolifération de ces cellules en lien avec une activation du processus régénératif (Kadi *et al.*, 2004b) et qui pourrait être interprété comme une tentative par les myocytes d'empêcher la fonte musculaire. De plus, bien que non significatif, les sujets SCA ont un plus grand nombre de fibres exprimant l'anticorps CD 56 au niveau cytoplasmique, ce qui suggère une incorporation de cellules satellites en rapport avec le remodelage tissulaire de ces sujets (Kadi *et al.*, 2004b). Cependant, d'autres signes qui vont dans le sens de la régénération du muscle, tels que l'internalisation nucléaire et les fibres segmentées (Dubowitz, 2007), sont plus importants chez les sujets SCT alors qu'il n'existe qu'une tendance à l'augmentation de l'internalisation nucléaire chez les sujets SCA. Ces résultats semblent indiquer que si le processus de régénération musculaire est activé chez les sujets hétérozygotes et homozygotes à la maladie, celui-ci ne semble pas aboutir à la même « efficacité » chez les sujets SCA. Cette différence qualitative du processus de régénération pourrait expliquer en partie pourquoi les sujets drépanocytaires présentent une perte de masse musculaire alors que ce n'est pas le cas chez les sujets porteurs du trait. En d'autres termes, si l'amyotrophie observée chez les sujets SCA peut être en partie liée à leur faible activité physique (Schumacher *et al.*, 1990, Buchowski *et al.*, 2002), on ne peut pas pour autant exclure un défaut dans le processus de régénération.

Cependant, ce remodelage demeure un phénomène d'amplitude modérée au regard de celui classiquement décrit au cours des maladies musculaires par exemple. En effet, on n'a pas retrouvé de signes en faveur d'un processus de dégénérescence, tels que la fibrose endomysiale ou des signes de myophagie et d'inflammation (présence de lymphocytes, de macrophages, ou de myocytes exprimant l'anticorps HLA classe I) chez les sujets drépanocytaires. Cela reste en accord avec les études antérieures ayant rapporté de rares myonécroses avec réponse inflammatoire minime dans les suites rapprochées d'épisodes de crises aiguës (Valeriano-Marcet et Kerr, 1991, Mani et Duffy, 1993). En revanche, l'intensité modérée de ce remodelage musculaire est comparable aux manifestations histologiques observées chez les patients BPCO où certains signes de remodelage musculaire ne sont pas

plus retrouvés que chez les sujets sains : internalisation nucléaire, fibres segmentées, fibres nécrotiques, et cellules inflammatoires (Gosker *et al.*, 2003).

III.4. Remodelage énergétique

L'analyse des enzymes clés du métabolisme énergétique ont révélé une diminution des activités β -HAD et CS chez les sujets drépanocytaires. Ces deux enzymes étant des marqueurs fiables et représentatifs de l'oxydation des acides gras et du cycle de Krebs, la diminution de ces deux activités témoigne d'une altération des capacités oxydatives du muscle squelettique. Cette altération est également confirmée, en histoenzymologie, par la diminution de l'activité COx sur les fibres de type IIa et IIx, qui représentent environ 56% de l'ensemble des myocytes chez ces sujets. L'activité COx apparaît donc maintenue sur les fibres de type I, ce qui est en accord avec le maintien relatif de ce contingent dans la distribution des fibres selon leur type et leur surface relative occupée. De plus, cela soutient l'hypothèse suggérée plus haut, selon laquelle dans la drépanocytose, les fibres de type I sont moins affectées que les autres types de fibres en raison d'une sollicitation chronique minimale. Enfin, ajoutons que là encore l'altération du métabolisme oxydatif est proportionnelle au taux d'HbS (Vincent *et al.*, 2010a, Vincent *et al.*, 2010b).

L'activité CK est également altérée chez les sujets SCA. Il a été montré dans la littérature que les activités CK et COx peuvent être inhibées ou au moins atténuées par les ROS (Schwarze *et al.*, 1998, Koufen *et al.*, 1999, Genet *et al.*, 2000, Di Giovanni *et al.*, 2001, Granata *et al.*, 2009). Bien connu dans le lit vasculaire en présence d'HbS (Rees *et al.*, 2010), on pourrait également suspecter un stress oxydant agissant sur le muscle des sujets drépanocytaires, comme cela a été observé pour d'autres tissus tels que le cerveau (Wood *et al.*, 2005, Kato *et al.*, 2009), le cœur (Wood *et al.*, 2008), le poumon (Wood *et al.*, 2008) et le rein (Nath *et al.*, 2001). Cette hypothèse reste néanmoins à vérifier. Bien que la fonction, la structure et le métabolisme de la mitochondrie n'ont jamais été étudié dans le muscle des sujets SCA, il a cependant été montré que l'hypoxémie augmente le stress oxydant musculaire et diminue la capacité mitochondriale de phosphorylation oxydative (Magalhaes *et al.*, 2005). De plus, suite à l'augmentation de l'HbS contenant des globules rouges auto-oxydés, les sujets drépanocytaires sont exposés à un stress oxydant important (Chaves *et al.*, 2008). C'est pourquoi, le stress oxydant pourrait effectivement jouer un rôle dans l'altération des capacités oxydatives du muscle squelettiques des sujets SCA.

Ainsi, l'amyotrophie et l'altération des capacités oxydatives observées chez les sujets SCA pourraient en partie contribuer à expliquer certaines altérations du tissu musculaire et leur intolérance à l'effort (Callahan *et al.*, 2002, Machado *et al.*, 2007).

III.5. Conclusion

Cette première étude témoigne pour la première fois d'un remodelage important sur les caractéristiques microvasculaires, structurales et énergétiques du muscle strié squelettique des sujets drépanocytaires. Le remodelage microvasculaire est caractérisé par i) une raréfaction du réseau capillaire, ii) une moindre tortuosité, iii) un élargissement du diamètre des microvaisseaux et iv) une fragilisation des capillaires. Ceci pourrait relever d'une adaptation permettant un maintien du débit sanguin local tout en tentant de limiter l'enclavement des hématies dans la microvascularisation. Le remodelage musculaire est quant à lui caractérisé par i) une nette amyotrophie, ii) une perte de la masse musculaire affectant principalement les fibres de type II, et iii) une diminution des capacités oxydatives du muscle.

ETUDE 2

I. Introduction à l'étude 2

Ces premiers résultats originaux obtenus lors de l'étude 1 nous ont donc amenés à poursuivre nos investigations, mais cette fois-ci concernant les répercussions musculaires sur la population féminine et la recherche d'un éventuel effet genre.

Les symptômes cliniques des sujets drépanocytaires ne sont pas différents entre les hommes et les femmes. Ainsi, on peut s'attendre à des répercussions musculaires chez les femmes SCA et à un moindre degré chez les femmes SCT. Cependant, il a été montré que l'HbF a un rôle protecteur dans la drépanocytose (Powars *et al.*, 1984, Platt *et al.*, 1991, Akinsheye *et al.*, 2011, Kaul *et al.*, 2013) en diminuant le taux d'HbS circulant et en empêchant sa polymérisation (Akinsheye *et al.*, 2011, Steinberg *et al.*, 2014). Or, plusieurs études ont rapporté l'existence d'un taux d'HbF plus important chez les femmes que chez les hommes drépanocytaires (Nagel et Ranney, 1990, Steinberg *et al.*, 1995, Nath *et al.*, 2004). On peut alors supposer que les répercussions musculaires chez les femmes SCA pourraient être moins marquées que celles rencontrées chez leurs homologues masculins.

Dans le même sens, Gladwin et collaborateurs (2003) ont observé un effet genre concernant la biodisponibilité du NO (Gladwin *et al.*, 2003) qui n'apparaît pas altérée chez les femmes SCA alors qu'on retrouve une diminution de NO chez les hommes SCA. Or on a vu que le NO joue un rôle majeur dans l'homéostasie vasculaire.

C'est pourquoi, nous émettons l'hypothèse que les répercussions musculaires rencontrées chez les femmes puissent être moins marquées que chez les hommes.

Pour répondre à cette problématique, nous avons pu réaliser une analyse histologique sur le muscle de 29 étudiantes camerounaises de l'Université de Yaoundé. Ce recueil nous a, là encore, permis de travailler sur une population drépanocytaire, hétérozygote et contrôle relativement homogène. Ces femmes étaient également réparties selon leur statut hémoglobinique de la façon suivante : 10 sujets contrôles, 10 sujets porteurs du trait drépanocytaire, et 9 sujets drépanocytaires. Ces nouvelles données ont été comparées à celles obtenues chez les hommes, présentées lors de l'étude 1.

II. Article 2

Structural, energetic and microvascular repercussions of sickle cell anemia on women muscle: women respond differently from men, Ravelojaona et al., 2014.

En préparation pour une soumission 2014 à Blood.

Structural, energetic and microvascular repercussions of sickle cell anemia on skeletal muscle of women differ from those observed in men

Marion Ravelojaona,¹ Laurent Messonnier,² Samuel Oyono-Enguélé,³ Charles Ewa'Sama Essoue, MD³; Ben Djoubairou, MD³ and Léonard Féasson^{1,4}

¹Université de Lyon, Laboratoire de Physiologie de l'Exercice EA4338, Saint Etienne, France ; ²Université de Savoie, Laboratoire de Physiologie de l'Exercice EA4338, Chambéry, France ; ³Université de Yaoundé, Faculté de Médecine, Laboratoire de Physiologie, Yaoundé, Cameroun ; ⁴Unité de Myologie – Centre Référent Maladies Neuromusculaires Rares Rhône-Alpes – CHU de Saint Etienne, Saint Etienne, France

Text word count: 4138; Abstract word count: 199; 7 Figures and Tables; 50 references.

Contact Information of the corresponding author:

Léonard Féasson

Laboratoire de Physiologie de l'Exercice EA 4338,

Unité de Myologie, CHU St Etienne – Hôpital Bellevue, 42055 St Etienne CEDEX 2, France

Phone: (33) 4 77 12 79 85

Fax: (33) 4 77 12 72 29

Email: leonard.feasson@univ-st-etienne.fr

Abstract

Sickle cell anemia (SCA) is an inherited blood disorder known for its severe hematologic and hemodynamic complications leading to vaso-occlusive crises. SCA also induces structural, energetic and microvascular muscle repercussions in the male population compared to male carriers of sickle cell trait (SCT) and male controls (CON). No study has been done on women skeletal muscle repercussions. We aim to assess repercussions of sickle cell anemia on women skeletal muscle and its microvasculature from muscle biopsies, and compare the remodeling to the one observed in men with sickle cell anemia. We show that women with SCA follow the same muscular remodeling as men, such as a change in fiber type I proportion, a muscle hypotrophy, a decrease in several oxidative enzyme activities, a decrease in capillary density and tortuosity and an enlargement of microvessels without a wall thickening. However, women with SCA have a less severe muscle atrophy, a lesser decrease of oxidative enzyme activities and a narrower capillary diameter than men with sickle cell anemia. It is concluded that sickle cell anemia induces a significant muscle remodeling in both men and women. Yet, muscle repercussions seem less severe in women than men with SCA, suggesting a gender effect.

Introduction

Sickle cell anemia (SCA) is a genetic hemoglobinopathy caused by a single point mutation substituting glutamic acid at the position β^6 of the β -globin chain by one valine, leading to the formation of hemoglobin HbS. In low pressure of oxygen, deoxygenated HbS polymerizes, leading to the formation of sickled red blood cells (RBCs), which are more rigid and fragile. These changing characteristics of the RBCs are responsible for the two major manifestations seen in SCA patients: hemolytic anemia and vaso-occlusive crises.¹ SCA is primarily known for its associated hemodynamic and microvascular disorders.²⁻⁴

Previous studies revealed that SCA patients are hypoactive and exercise intolerant,⁵⁻⁷ suggesting muscular repercussions of SCD. In accordance, changes in muscle fiber types distribution, a clear amyotrophy, a decline in muscle oxidative potential and an important microvascular remodeling (characterized by decreases in capillary density and tortuosity and increases in capillary diameter and apparent fragility) were observed in skeletal muscle of male patients with SCA (Ravelojaona *et al.*, Article 1). Because muscle remodeling observed in carriers of sickle cell trait were for the most part intermediary between patients with SCA and control subjects (Ravelojaona *et al.*, Article 1), HbS proportion seemed to be a critical determinant of the remodeling.

No pathophysiological difference has been described between men and women with SCA. From that point of view, a muscular remodeling is also expected to be found in women with SCA and to a lesser extent with SCT. However, it has been demonstrated that fetal hemoglobin (HbF), by decreasing HbS proportion and most importantly by preventing HbS polymerization,⁸ protects SCA patients from sickling, vaso-occlusive and reperfusion episodes,⁸⁻¹². Moreover, administration of hydroxyurea, which raises HbF level, ameliorates patients' pathophysiology.^{2,13,14} Interestingly, previous experiments have reported that HbF level is higher in female populations.¹³ Because a higher HbF level implies a lower HbS level and because HbF improves pathophysiology of SCA, it can be assumed that muscle repercussions of SCA might be lesser in women than in men.

Gender effect has been observed in cardiopathies and Canali *et al*¹⁵ observed a better myocardial salvage after reperfusion in women. The authors stated that women might have a better tolerance to tissue hypoxia and a better reperfusion pattern in response to ischemic injury. They also inferred that this protective mechanism might come from estrogens which intervene in several signaling pathways leading to a lesser ischemia-induced apoptotic cell

death¹⁶ and tissue damage. Since SCA also induces ischemia-reperfusion injuries,^{14,17} muscle of adult women with SCA could be, at least to some extent, protected by estrogens.

Because of limited information on muscle characteristics of SCA women, the aim of the present investigation was two folds. We aimed to demonstrate the structural, energetic and microvascular remodeling of skeletal muscle of women with SCA compared to sickle cell trait (SCT) carriers and controls (CON) and tested the hypothesis that skeletal muscle of women with SCA would be less affected than that of male patients (Ravelojaona *et al.*, Article 1).

Design and Methods

Subjects

29 Cameroonian women participated in the study and were assigned to one of the three following groups: CON ($n = 10$), SCT carriers ($n = 10$) and SCD patients ($n = 9$). Age, height and weight were 23 ± 1 yr, 162 ± 2 cm and 60 ± 4 kg (mean \pm SE). The study took place at the General Hospital of Yaoundé (Cameroon). The experimental protocol was approved by the local ethics committee (no. 02–06-2007) and was in accordance with the guidelines set by the Declaration of Helsinki for human studies. Data analysis was performed at the Hospital of Saint-Etienne. Before giving their written consent, all subjects were fully informed of the objectives and possible risks and/or discomforts related to the experiments.

Inclusion protocol

Subjects were recruited by posted notices and word of mouth. All subjects underwent a preliminary screening including: a physical examination, anthropometric measurements and blood sampling. Blood samples were assayed for HbA1, HbA2, HbS and HbF, and also for hemoglobin concentration (Hb) and hematocrit (Hct). Positive tests for SCA and SCT were determined by the presence of HbS at a level higher and lower than 50%, respectively. Volunteers who 1) suffered from a malaria episode within the past two months, 2) had more than three vaso-occlusive crises (requiring hospitalization) per year, 3) were taking any medications, 4) tested positive for HIV, and/or 5) took part in another research program, were not included in the study.

Muscle biopsy

While the subjects were in the *dorsal decubitus* position on a bed, a muscle biopsy of the *vastus lateralis* of the right leg (~ 150 mg) was performed under local anesthesia using a Weil-Blakesley forceps and a percutaneous technique used routinely by our group.¹⁸ Part of the biopsy sample was oriented under a stereo microscope and mounted in cryomount[®] (Histolab, Göteborg, Sweden), then frozen in isopentan and stored in liquid nitrogen until histochemical and immunohistochemical analyses. In that purpose, cryostat serial transverse sections of 10 μ m thick were cut using a microtome at -20°C (HM 560, Microm, Walldorf, Germany). The remainder of the sample was rapidly frozen and stored in liquid nitrogen until energetic enzymes activities analyses.

Muscle fiber determination and morphology

Fiber type was determined on immunohistochemical preparations using anti-fast IIA myosin heavy chain N2.261 (Alexis Biochemicals) and anti-slow myosin heavy chain A4.951 (Alexis Biochemicals) monoclonal antibodies. The fiber types were designated as I, I-IIa, IIa, IIa-IIx and IIx (previously referred to as IIb by Brooke and Kaiser¹⁹). Fibers morphometric analysis included determination of fiber surface area and perimeter.

Muscle degeneration and regeneration

Classical muscle remodeling signs seen in muscle dystrophies²⁰ such as necrotic fibers, fibrosis, fat cells, inflammation signs, internalized nuclei and segmented fibers were looked for through Hemalum Eosin Safran (HES) coloration. Count of regenerated fibers and satellite cells was performed using monoclonal antibody CD 56 (mouse-anti-human, Dako, M7304, Glostrup, Denmark).

Enzyme activities

Phosphofructokinase (PFK), lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), citrate synthase (CS), β -hydroxylacyl-CoA dehydrogenase (β -HAD) activities were measured fluorometrically at room temperature (SFM25 fluorometer, Kontron Instruments, Everett, WA, USA) using an excitation wavelength of 340 nm and an emission wavelength of 450 nm. Cytochrome *c* oxidase (COx) activity was assessed on muscle slices incubated for 120 min in reaction medium (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), saccharose (Carlo Erba Reagents, Milan, Italy), cytochrome *c* (Sigma Biochemical, Poole, UK), catalase (Sigma-Aldrich), then rinsed in distilled water and dehydrated in alcohol. Measurements of COx activity were performed after converting the image to gray scale in order to determine optical density for each fiber. COx activity was then expressed by fiber type.²¹

Microvascular remodeling

Identification and morphometric analysis of microvessels were performed using monoclonal antibody CD31 (mouse anti-human-anti-mouse, Dako, M0823, Glostrup, Denmark) which recognizes Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1), a transmembraneous glycoprotein strongly expressed by vascular endothelial cells. CD31 successfully allowed to identify vascular endothelium in healthy muscle.²² Capillary density (CD), the number of capillaries in contact with one fiber (CAF), the length of contact between

one muscle fiber and the adjacent capillaries divided by the fiber perimeter (LC/PF), microvessels diameter (COD) and capillary tortuosity (CapTor) were assessed.²³ The functional index CD x capillary surface area (CSA), estimating volume of blood in the 10 µm thick section, was also measured.²³

Immunofluorescence (double staining CD31/smooth muscle myosin heavy chain) was realized in order to identify the presence of smooth muscle in the capillary wall.

Microscopy and analysis

Muscle sections were observed under a light microscope (Leica DM2000, Leica, Heerbrugg, Germany) connected to a digital camera (Leica DFC490, Leica). Pictures were taken at 1) x100 optical magnification for muscle fiber type distribution, morphology and remodeling, 2) at x50 coupled with a 1.25 digital magnification for quantitative analysis of the microvascular network (*i.e.*, CD) and 3) at x400 optical magnification for morphometric analyses of microvessels (*i.e.*, COD). Pictures were analyzed using SigmaScan Pro 5.0 software (SPSS Science, Chicago, Illinois, USA).

Statistical analysis

Descriptive statistics are expressed as mean \pm standard error (SE). ANOVA followed by a Fisher post hoc test were used to compare muscle remodeling among CON, SCT and SCA women. Differences between values of each group were considered to be significant for $P < .05$ and to represent a tendency for $.05 \leq P < .1$. In addition, the present results were compared to those obtained in 27 male subjects whom results were presented in a previous paper (Ravelojaona *et al.*, Article 1). Gender differences were assessed using a two-way ANOVA. Statistical significance was set at $P < .05$.

Results

Women's anthropometric characteristics

No statistical differences were found in body mass and BMI among CON, SCT and SCA (Table 1). As expected, lower hemoglobin ($P < .0001$ for both) and hematocrit ($P < .0001$ for both) levels were found in SCA compared to SCT carriers and CON, confirming severe anemia in SCA subjects (Table 1).

*** Insert Table 1 ***

Skeletal muscle structural remodeling in women

Percentage of type I muscle fibers was lower in SCA (32.9 ± 1.9 %, $P = .0389$) and SCT (31.8 ± 3.7 %, $P = .0213$) than in CON (41.1 ± 2.3 %), with no difference between SCT and SCA (Figure 1A). Otherwise, no difference was found in distribution of all other fiber types among the three groups. No statistical differences were found in term of fibers surface area, whatever the fiber type, although the mean surface area for type IIa fibers tended to be smaller by 19% in SCA (2712 ± 203 μm^2) than in CON (3341 ± 298 μm^2 , $P = .0595$), while SCT value (3244 ± 120 μm^2) was not different from the two other groups (Figure 1B). The strong tendency toward a reduction of surface area for 100 myocytes (taking into account fiber type distribution) revealed a slight amyotrophy in SCA women ($P = .0563$) compared to CON (Figure 2).

*** Insert Figure 1 ***

*** Insert Figure 2 ***

Degenerative and regenerative remodeling in women

Concerning degenerative signs, no differences were found in term of tissue necrosis, fibrosis and inflammatory signs among the three groups. However, more fat cells were observed in SCA compared to SCT ($P = .0161$) who already have more adipocytes than CON ($P = .0279$). In terms of regenerative signs, there were no differences regarding internalized nuclei and fibers that incorporated satellite cells among the three groups. However, a higher pool of satellite cells was seen in SCA and SCT patients compared to CON ($P = .003$ and $P = .012$, respectively), with no difference between SCA and SCT.

Enzyme activities in women

CK activity was lower in SCA patients than in CON ($P = .0153$), and intermediary in SCT (with no differences with the two other groups, Table 2). PFK activity tended to be higher in SCA compared to CON ($P = .0676$), and intermediary in SCT (with no differences with the two other groups, Table 2). Moreover, SCA patients displayed lower CS and β -HAD activities than CON ($P = .0026$ and $P = .0129$, respectively) and SCT ($P = .0106$ and $P = .0729$, respectively), with no difference between the two latter groups (Table 2). LDH and COx activities were not different among the three groups (Table 2).

*** Insert Table 2 ***

Microvascular remodeling in women

Lower capillary density (CD) (Figure 3A) and number of capillaries in contact with a muscle fiber (CAF, Table 3) were found in SCA compared to SCT ($P = .0004$ and $P = .0001$, respectively) and CON ($P < .0001$ for both). CD was also lower in SCT than in CON ($P < .0187$). The estimated blood volume in the 10 μm slice (CD x CSA) was higher in SCA ($P = .0055$) and tended to be higher in SCT compared to CON ($P = .0619$), with no difference between SCA and SCT (Table 3). Capillary tortuosity (CapTor) was lower in SCA and SCT compared to CON ($P < .0001$ and $P = .0003$, respectively), with no difference between SCA and SCT (Table 3). The contact length between capillary and muscle fiber over the fiber perimeter (LC/PF) was drastically lower in SCA compared to SCT and CON ($P = .0124$ and $P < .0001$, respectively), and was also lower in SCT compared to CON ($P = .0043$; Table 3).

*** Insert Table 3 ***

*** Insert Figure 3 ***

Moreover, a higher capillary outer diameter (COD) was found in SCA compared to SCT ($P < .0001$), which is already higher than in CON ($P = .0005$; Figure 4A). This increase of COD observed in SCA resulted in higher number (Figure 4B) and percentage (Figure 4C) of wide microvessels (characterized by a COD greater than 10 μm) in SCA patients compared to SCT ($P = .0133$ and $P = .0093$, respectively) and CON ($P = .0051$ and $P = .0058$, respectively), with no differences between the two latter groups. On the other hand, SCA displayed lower number (Figure 4B) and percentage (Figure 4C) of narrow microvessels (COD < 5 μm) compared to SCT ($P = .0004$ and $P < .0001$, respectively) and CON ($P < .0001$ for both). SCT also displayed lower number and percentage of narrow microvessels

compared to CON ($P < .0001$ for both). No smooth muscle was found around microvessels whatever the groups.

*** Insert Figure 4 ***

SCA and gender effect (Table 4)

No statistical difference was observed in term of body mass and BMI between men and women with SCA. A lower hemoglobin level was found in women with SCA compared to men with SCD ($P = .0413$) and the hematocrit tended to be lower in women ($P = .0565$). Concerning fiber type distribution, a higher percentage of type I muscle fiber was found in men ($P = .0203$) whereas women tended to have or displayed higher proportion of type IIa and IIa-IIx muscle fibers ($P = .058$ and $P = .0246$). Besides, men tended to have bigger fibers of type IIa ($P = .0576$), IIa-IIx ($P = .0811$) and IIx ($P = .0856$) fibers than women. However, the surface area covered by 100 myocytes including fiber type distribution was not different.

Concerning muscular remodeling, no necrosis, fibrosis and inflammation were observed in either men or women with SCA. However, concerning regenerative signs, men with SCA displayed a higher pool of satellite cells and a higher number of cells expressing CD 56 ($P < .0001$ and $P = .0101$, respectively) than women with SCA (Table 4).

Regarding enzyme activities, no difference was found between men and women with SCA.

In term of microvascular remodeling, men with SCA displayed a greater CD ($P = .0039$) accompanied by a bigger CAF ($P = .0002$) than women with SCA. Moreover, a bigger COD was observed in men ($P = .0131$), resulting in a higher percentage of wide capillaries ($COD > 10 \mu\text{m}$, $P = .004$). In turn, a higher percentage of smaller capillaries ($COD < 5 \mu\text{m}$ and $5 \mu\text{m} < COD < 10 \mu\text{m}$) was observed in women with SCA ($P = .0046$ and $P = .0072$, respectively). The ratio LC/PF ($P < .0001$) and the product CD x CSA ($P = .0058$) were higher in men with SCA than in women with SCA. No capillary wall thickening assessed by the double staining in immunofluorescence was observed in either men or women with SCA. No difference was found in capillary tortuosity (CapTor) either.

*** Insert Table 4 ***

Comment

The aims of the study were to characterize skeletal muscle of women with SCA and to compare muscle repercussions in men and women.

Muscle remodeling in women with SCA

As expected, the results of the present study underlined an important remodeling of skeletal muscle in women with SCA. Concerning the muscle structural characteristics, SCA was associated with a modification of fiber type distribution characterized by a decrease in the percentage of type I muscle fiber proportion, already noticeable in SCT. Furthermore, the number of satellite cells and intercellular adipocytes were higher in women with SCA than in their CON counterparts. Interestingly, the surface area of any fiber type was not significantly altered in SCA women. However, although non-significant, women with SCA displayed a 20% reduction of muscle surface area for 100 myocytes taking into account fiber type distribution, revealing a slight hypotrophy.

From the energetic standpoint, CK activity, which can be considered a muscle energetic shuttle, was decreased in women with SCA compared to their CON counterparts. Furthermore, COx activity, which refers to mitochondrial function, was not significantly altered in SCA, whatever the muscle fiber type. However, muscle oxidative potential was partially altered in women with SCA. Indeed, activities of β -HAD and CS, two enzymes of fat metabolism and Krebs cycle, respectively, were lower in SCA female patients. In that context, it does not appear so surprising that activity of PFK, which is a key enzyme of the glycolytic pathway, tended to be higher in women with SCA. A shift towards an anaerobic metabolism can be suspected in women with SCA as it is suggested in men with SCT.²⁴

From the microvascular point of view, women with SCA displayed lower CD and CAF that testifies of a rarefaction of the microvascular network. They also displayed a lower CapTor that argues in favor of a loss of exchange capacities between the vascular bed and the adjacent muscle fibers. The higher COD which attests of an enlargement of the microvessels may contribute to some extent to dampen erythrocytes entrapment in the microvasculature. This enlargement of the microvessels in women with SCA counteracts the lower CD, and even more, with a higher estimated blood volume crossing the muscle section (i.e., CD x CSA) than in CON. This may participate to improve blood supply and compensate for at least to some extent the lower total hemoglobin, tempting to maintain oxygen supply to tissue.

Similarities and divergences in muscle remodeling between women and men with SCA

The remodeling observed in women with SCA is for the major part consistent, but not always (*vide infra*), with that observed in men with SCA (Ravelojaona *et al.*, Article 1). Furthermore, even when concordant, the magnitude of the remodeling is often smoother in women than in men.

On the muscle point of view, mean surface areas of all fiber types seemed to be less affected in women with SCA compared to their CON counterparts than in men. Although non-significant, the mean type I fiber surface area was even higher in women than in men with SCA. Moreover, number of satellite cells, fibers positive for CD56 staining and adipocytes were lower in women than in men. It is tempting to interpret the relative maintenance of muscle fiber surface area in women with SCA than in their male counterparts, as a lesser muscle suffering and wasting. The lower number of adipocytes which testifies of a lesser muscle degeneration and the lower numbers of satellite cells and fibers positive for CD56 which indicates a lesser need for muscle regeneration would tend to support this interpretation.

On the microvascular point of view, the capillary outer diameter and the percentage and number of microvessels $> 10 \mu\text{m}$ were lower while the percentage and number of microvessels $< 5 \mu\text{m}$ and between 5 and $10 \mu\text{m}$ were higher in women than in men with SCA. Furthermore, CapTor seemed to be less affected in women with SCD compared to their CON counterparts than in men.

Taken together, these data seem to indicate that as a whole, muscle structural and microvascular characteristics would be less affected in women than in men with SCA, suggesting that women might be, at least to some extent, protected.

If this interpretation is correct then it is somewhat surprising that oxidative enzyme activities were not higher in women than in men and that capillary density was drastically decreased in women. The explanation may lie on muscle fiber type distribution. While type I fibers are known to display the highest oxidative enzyme activities and capillary network,^{19,25,26} women with SCA exhibited a drastic decrease in type I muscle fibers compared to men with SCA. However, the explanation for the decreased type I fiber proportion in women with SCA remains unknown. Interestingly, the lower type I fiber proportion was already observed in women with SCT compared to women CON. In that respect and comparing with men of the present study or other studies,^{21,27} a surprisingly high proportion of type I muscle fiber is found in women CON and further investigations are needed to understand this observation.

These results of the present study raise the question of knowing what may explain these differences between men and women. Several hypotheses can be formulated. First, the divergences reported here between men and women with SCA on the repercussions of SCA on skeletal muscle could be due to the different lifestyle between men and women. Indeed, a lower active lifestyle may account for lower fiber surface area in women CON than in men CON, while mean fiber surfaces do not differ drastically between men and women when both become highly sedentary with SCA. Moreover, type I muscle fiber are the first myocytes to be recruited,²⁸ which could explain why women CON have a higher proportion of type I fiber than men CON. However, this hypothesis cannot explain the lower satellite cell number, adipocytes and CD56+ in women with SCA, neither the lower COD. Another suggestion might be anemia. In several studies, it was observed that SCA patients with lower hemoglobin and/or hematocrit levels have less severe and frequent painful crises.^{10,29,30} In accordance, anemia was more severe in women with SCA than in men with SCA, and could probably partly explain differences encountered on muscle of men and women with SCA. A third hypothesis could be related to HbF. It is known that a high HbF level has a protective effect on the disease, with reduced painful episodes, less severe complications (vaso-occlusive crises and acute chest syndrome) and better survival rate.^{8-10,31-33} Although non-significant, our female population with SCA had a 65% higher proportion of HbF than the male population as it is observed in the literature.^{34,35} However, taking into account total Hb since women with SCA have a lower Hb level, HbF concentration was similar in men and women. The last hypothesis is therefore related to HbS. Pathophysiological manifestations of the disease are known to be related HbS. If percentage of HbS is not different in men and women, the lower total hemoglobin level in the latter group turned to lower HbS levels in women than in men. It is tempting to attribute, at least partly the less drastic muscle repercussions observed in women than men with SCA to HbS level.

Moreover, these differences on muscle repercussions between men and women with SCA could also come from sex hormones. In cardiopathies, it is known that women have less severe repercussions due to a higher level of estrogens.^{15,36,37} Estrogen has a protective effect on ischemia-reperfusion,^{16,38-41} and therefore women are more resistant than men to ischemia.¹⁶ Since patients with SCA are subjected to ischemia-reperfusion,^{12,14,17} we can suppose that women with SCA would better tolerate ischemia than men with SCA and have a better reperfusion. Therefore this could partially explain why women have less severe muscle repercussions than men.

Canali et al¹⁵ also observed that after a primary coronary angioplasty, which mimics ischemia-reperfusion injury, women have less microvascular damage than men. Yet, this is not totally the case on our SCA female population compare to SCA male population since we observed a greater decrease of DC in women with SCA. However, this could be explained by the relative increase of type I muscle fibers in men with SCA as reported above. Moreover, a greater activity of matrix metalloproteinases (MMPs) was found in male mice during early remodeling after acute myocardial infarction^{36,42} compared to female mice. Since MMPs are known to play a role for angiogenesis,⁴³⁻⁴⁶ this could partly explain why men with SCA have a less severe decrease of DC than women with SCA ($P = 0.0039$). Because a greater CD was observed in men with SCA, the estimated exchange surface area was less affected in men. Besides, this greater CD encountered in men could be associated with the higher pool of satellite cells seen in men compared to women as it has been demonstrated that satellite cells can promote angiogenesis.^{47,48}

An enlarged COD was observed in both men and women with SCA without a wall thickening. However, men with SCA displayed a higher COD than women, yet the relative increase was the same compared to their respective controls (approximately +75%) since men appear to have wider vessels than women.^{49,50}

Conclusion

The results of this study showed that women with SCA followed the same muscle structural, energetic and microvascular repercussions observed previously in men with SCA (Ravelojaona *et al.*, Article 1). The present study also suggested a gender effect since muscle of women with SCA seemed to be less affected by the disease than those of men, but this latter hypothesis needs further investigations.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Embassy of France in Cameroon, the Région Rhône-Alpes (CIBLE 2011), and the Ministry of Higher Education of Cameroon. The authors thank Marie-Pierre Blanc, Dominique Gouttefangeas (Université de Lyon, Laboratoire de Physiologie de l'Exercice EA4338, Saint Etienne, France), Jean-Pierre Lamarque, François-Xavier Owona, Philippe Stoft and Patrice Thiriet for their helpful technical assistance. The logistic supports offered by the Institut National de la Jeunesse et des Sports of Yaoundé, the Ministry of Higher Education of Cameroon, the Embassy of France in Cameroon and Les Brasseries du Cameroun are also recognized.

Authorship

Contribution: M.R., did the literature search, designed the figures, did the statistical analyses, collected, analysed and interpreted the data and wrote and reviewed the manuscript; L.F., conceived and designed the study, did the literature search, collected, analysed and interpreted the data and wrote and reviewed the manuscript; S.O-E., B.D., and C.E., conceived and designed the study, collected the data and wrote and reviewed the manuscript. L.M., conceived and designed the study, did the literature search, collected, analysed and interpreted the data and wrote and reviewed the manuscript.

Disclosure: The authors declare no competing financial interests.

References

1. Serjeant G. *Sickle Cell Disease*. Second Edition ed: Oxford University press; 1992.
2. Ballas SK, Mohandas N. Sickle red cell microrheology and sickle blood rheology. *Microcirculation*. Mar 2004;11(2):209-225.
3. Hebbel RP, Leung A, Mohandas N. Oxidation-induced changes in microrheologic properties of the red blood cell membrane. *Blood*. Sep 1 1990;76(5):1015-1020.
4. Hebbel RP. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest*. Jun 1 1997;99(11):2561-2564.
5. Callahan LA, Woods KF, Mensah GA, Ramsey LT, Barbeau P, Gutin B. Cardiopulmonary responses to exercise in women with sickle cell anemia. *Am J Respir Crit Care Med*. May 1 2002;165(9):1309-1316.
6. Machado RF, Mack AK, Martyr S, et al. Severity of pulmonary hypertension during vaso-occlusive pain crisis and exercise in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol*. Jan 2007;136(2):319-325.
7. Connes P, Machado R, Hue O, Reid H. Exercise limitation, exercise testing and exercise recommendations in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc*. Jan 1 2011;49(1):151-163.
8. Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*. Jul 7 2011;118(1):19-27.
9. Mpalampa L, Ndugwa CM, Ddungu H, Idro R. Foetal haemoglobin and disease severity in sickle cell anaemia patients in Kampala, Uganda. *BMC blood disorders*. 2012;12:11.
10. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, et al. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med*. Jul 4 1991;325(1):11-16.
11. Powars DR, Weiss JN, Chan LS, Schroeder WA. Is there a threshold level of fetal hemoglobin that ameliorates morbidity in sickle cell anemia? *Blood*. Apr 1984;63(4):921-926.
12. Kaul DK, Fabry ME, Suzuka SM, Zhang X. Antisickling fetal hemoglobin reduces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in normoxic sickle mice: microvascular implications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jan 1 2013;304(1):H42-50.
13. Nath KA, Katusic ZS, Gladwin MT. The perfusion paradox and vascular instability in sickle cell disease. *Microcirculation*. Mar 2004;11(2):179-193.
14. Gladwin MT, Sachdev V. Cardiovascular abnormalities in sickle cell disease. *J Am Coll Cardiol*. Mar 27 2012;59(13):1123-1133.
15. Canali E, Masci P, Bogaert J, et al. Impact of gender differences on myocardial salvage and post-ischaemic left ventricular remodelling after primary coronary angioplasty: new insights from cardiovascular magnetic resonance. *European heart journal cardiovascular Imaging*. Nov 2012;13(11):948-953.
16. Versi E. Oestrogen and protection against myocardial ischaemia. *Lancet*. Oct 2 1993;342(8875):871.
17. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011;17(11):1391-1401.
18. Feasson L, Stockholm D, Freyssenet D, et al. Molecular adaptations of neuromuscular disease-associated proteins in response to eccentric exercise in human skeletal muscle. *J Physiol*. Aug 15 2002;543(Pt 1):297-306.
19. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol*. Oct 1970;23(4):369-379.
20. Dubowitz V, Sewry, CA. *Muscle Biopsy A practical Approach*. 2007.

21. Vincent L, Feasson L, Oyono-Enguelle S, et al. Skeletal muscle structural and energetic characteristics in subjects with sickle cell trait, alpha-thalassemia, or dual hemoglobinopathy. *J Appl Physiol*. Sep 2010;109(3):728-734.
22. Charifi N, Kadi F, Feasson L, Costes F, Geysant A, Denis C. Enhancement of microvessel tortuosity in the vastus lateralis muscle of old men in response to endurance training. *J Physiol*. Jan 15 2004;554(Pt 2):559-569.
23. Vincent L, Feasson L, Oyono-Enguelle S, et al. Remodeling of skeletal muscle microvasculature in sickle cell trait and alpha-thalassemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Feb 2010;298(2):H375-384.
24. Bile A, Le Gallais D, Mercier B, Martinez P, Ahmaidi S, Prefaut C. Anaerobic exercise components during the force-velocity test in sickle cell trait. *Int J Sports Med*. May 1996;17(4):254-258.
25. Hudlicka O, Brown M, Egginton S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev*. Apr 1992;72(2):369-417.
26. Needham DM. Red and white muscles. *Physiological Reviews*. 1926;6(1):1-27.
27. Ama PF, Simoneau JA, Boulay MR, Serresse O, Theriault G, Bouchard C. Skeletal muscle characteristics in sedentary black and Caucasian males. *J Appl Physiol*. Nov 1986;61(5):1758-1761.
28. Vollestad NK, Blom PC. Effect of varying exercise intensity on glycogen depletion in human muscle fibres. *Acta Physiol Scand*. Nov 1985;125(3):395-405.
29. Baum KF, Dunn DT, Maude GH, Serjeant GR. The painful crisis of homozygous sickle cell disease. A study of the risk factors. *Arch Intern Med*. Jul 1987;147(7):1231-1234.
30. Lande WM, Andrews DL, Clark MR, et al. The incidence of painful crisis in homozygous sickle cell disease: correlation with red cell deformability. *Blood*. Dec 1988;72(6):2056-2059.
31. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*. Jun 9 1994;330(23):1639-1644.
32. Bhatnagar P, Keefer JR, Casella JF, et al. Association between baseline fetal hemoglobin levels and incidence of severe vaso-occlusive pain episodes in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer*. Oct 2013;60(10):E125-127.
33. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*. Jul 15 1994;84(2):643-649.
34. Rutland PC, Pembrey ME, Davies T. The estimation of fetal haemoglobin in healthy adults by radioimmunoassay. *Br J Haematol*. Apr 1983;53(4):673-682.
35. Dover GJ, Smith KD, Chang YC, et al. Fetal hemoglobin levels in sickle cell disease and normal individuals are partially controlled by an X-linked gene located at Xp22.2. *Blood*. Aug 1 1992;80(3):816-824.
36. Kolodgie FD, Farb A, Litovsky SH, et al. Myocardial protection of contractile function after global ischemia by physiologic estrogen replacement in the ovariectomized rat. *Journal of molecular and cellular cardiology*. Sep 1997;29(9):2403-2414.
37. Olivetti G, Giordano G, Corradi D, et al. Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol*. Oct 1995;26(4):1068-1079.
38. Enns DL, Tiidus PM. The influence of estrogen on skeletal muscle: sex matters. *Sports medicine*. Jan 1 2010;40(1):41-58.

39. Booth EA, Flint RR, Lucas KL, Knittel AK, Lucchesi BR. Estrogen protects the heart from ischemia-reperfusion injury via COX-2-derived PGI₂. *J Cardiovasc Pharmacol*. Sep 2008;52(3):228-235.
40. Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Minamino T, Funaya H, Hori M. Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by 17beta-estradiol: role of nitric oxide and calcium-activated potassium channels. *Circulation*. Sep 16 1997;96(6):1953-1963.
41. Delyani JA, Murohara T, Nossuli TO, Lefer AM. Protection from myocardial reperfusion injury by acute administration of 17 beta-estradiol. *Journal of molecular and cellular cardiology*. May 1996;28(5):1001-1008.
42. Cavasin MA, Tao Z, Menon S, Yang XP. Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice. *Life Sci*. Sep 17 2004;75(18):2181-2192.
43. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. Apr 2000;6(4):389-395.
44. Rivilis I, Milkiewicz M, Boyd P, et al. Differential involvement of MMP-2 and VEGF during muscle stretch- versus shear stress-induced angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Oct 2002;283(4):H1430-1438.
45. Haas TL, Milkiewicz M, Davis SJ, et al. Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Oct 2000;279(4):H1540-1547.
46. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular research*. Feb 16 2001;49(3):507-521.
47. Christov C, Chretien F, Abou-Khalil R, et al. Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol Biol Cell*. Apr 2007;18(4):1397-1409.
48. Abou-Khalil R, Mounier R, Chazaud B. Regulation of myogenic stem cell behavior by vessel cells: the "menage a trois" of satellite cells, periendothelial cells and endothelial cells. *Cell Cycle*. Mar 1;9(5):892-896.
49. Hansen F, Mangell P, Sonesson B, Lanne T. Diameter and compliance in the human common carotid artery--variations with age and sex. *Ultrasound in medicine & biology*. 1995;21(1):1-9.
50. Lindekleiv HM, Valen-Sendstad K, Morgan MK, et al. Sex differences in intracranial arterial bifurcations. *Gender medicine*. Apr 2010;7(2):149-155.

Tables

Table 1: Anthropometric, Hemoglobinic and Hematologic data of the female population

	CON <i>n</i> = 10	SCT <i>n</i> = 10	SCA <i>n</i> = 9
Anthropometric data			
Age (yr)	21.8 ± 0.4	22.3 ± 0.9	25.1 ± 2.0 †
Height (cm)	161.5 ± 2.9	158.4 ± 2.1	166.4 ± 3.9 \$
Body mass (kg)	59.7 ± 2.3	58.3 ± 2.1	60.7 ± 3.8
BMI (kg/m²)	23.0 ± 1.0	23.2 ± 0.6	21.8 ± 0.9
Hemoglobinic and Hematologic data			
HbA1 (%)	77.9 ± 0.7	49.4 ± 0.9 ***	2.0 ± 0.08 *** ###
HbA2 (%)	2.0 ± 0.05	4.3 ± 0.2 **	7.4 ± 0.9 *** ###
HbS (%)	n/a	33.6 ± 0.8	78.2 ± 1.4
HbF (%)	n/m	0.4 ± 0.2	7.6 ± 1.6 *** ###
Hb (g/dL)	11.6 ± 0.3	11.6 ± 0.2	7.2 ± 0.4 *** ###
Hct (%)	34.6 ± 0.9	34.5 ± 0.7	20.7 ± 1.2 *** ###

Values are mean ± SE. *n*: number of subjects; HbA1: hemoglobin A1; HbA2: hemoglobin A2; HbS: hemoglobin S; HbF: hemoglobin F; Hb: hemoglobin total; Hct: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume. † different from CON with $.05 < P < .1$, \$ different from SCT with $.05 < P < .1$, ** different from CON with $P < .01$, *** different from CON with $P < .001$, ### different from SCT with $P < .001$. n/a: not applicable, n/m: not measured.

Table 2: Enzyme activities in the female population

	CON <i>n</i> = 10	SCT <i>n</i> = 10	SCA <i>n</i> = 9
CK	1851.1 ± 46.1	1702.7 ± 77.7	1607.2 ± 70.1 *
PFK	291.5 ± 13.0	303.4 ± 12.4	326.4 ± 13.2 †
LDH	881.9 ± 40.5	831.8 ± 34.9	810.8 ± 42.1
CS	19.9 ± 0.8	19.1 ± 1.1	15.5 ± 0.8 ** #
β-HAD	16.4 ± 0.5	15.4 ± 1.3	13.0 ± 0.6 * \$
COx Type I	175.2 ± 3.9	181.3 ± 4.0	173.5 ± 2.8
 Type IIa	140.5 ± 4.0	146.5 ± 3.7	142.6 ± 3.5
 Type IIx	130.9 ± 3.3	127.7 ± 2.6	125.8 ± 3.1

Values are mean ± SE. For CK, PFK, LDH, CS and β-HAD activities, values are expressed in $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ dry muscle and for COx activity, values are expressed in A.U. (arbitrary unit).

CK: creatine kinase; PFK: phosphofructokinase; LDH: lactate dehydrogenase; CS: citrate synthase; β-HAD: β-hydroxylacyl-Co-A-dehydrogenase; COx: cytochrome *c* oxydase. *

different from CON with $P < .05$, # different from SCT with $P < .05$. Other symbols: as in

Table 1.

Table 3: Microvascular remodeling in women

	CON <i>n</i> = 10	SCT <i>n</i> = 10	SCA <i>n</i> = 9
CD (cap/mm²)	411.5 ± 23.3	339.1 ± 22.6 *	223.4 ± 12.8 *** ###
CAF	3.80 ± 0.33	3.36 ± 0.26	1.79 ± 0.1 *** ###
CD x CSA (x1000)	8432 ± 945	10849 ± 727 †	12288 ± 950 **
CapTor	1.973 ± 0.103	1.611 ± 0.035 ***	1.558 ± 0.028 ***
LC/PF (%)	11.28 ± 0.99	8.14 ± 0.72 **	5.53 ± 0.26 *** #
CD x CP	8202 ± 616	8150 ± 494	6821 ± 322 † \$

Values are mean ± SE. CD: capillary density (cap.mm⁻²); CAF: number of capillaries in contact with a fiber; CD x CSA: capillary density x capillary surface area; CapTor: capillary tortuosity (CSA/π(COD/2)²); LC/PF: length of capillaries in contact with a fiber divided by the fiber perimeter (%); CD x CP: capillary density x capillary perimeter. Symbols: See Tables 1 and 2.

Table 4: Gender effect of sickle cell anemia on skeletal muscle

	Gender	CON	SCT	SCA
Anthropometric data				
Body mass (kg)	W	59 ± 2 ‡	58 ± 2 ‡	61 ± 4
	M	72 ± 2 ‡	68 ± 2 ‡	59 ± 3 *** #
BMI (kg/m ²)	W	23 ± 1	23 ± 1	22 ± 1
	M	23.1 ± 0.6	21.9 ± 0.4	20.6 ± 0.8 **
Hemoglobinic and Hematologic data				
HbS (%)	W	na	33.6 ± 1.9	78.2 ± 1.4
	M	na	31.65 ± 1.89 ***	80.90 ± 2.02 *** ###
HbF (%)	W	nm	0.4 ± 0.2	7.6 ± 1.6
	M	nm	0.08 ± 0.08	4.63 ± 1.36 *** ###
Hb (g/dL)	W	11.6 ± 0.3 ‡	11.6 ± 0.2 ‡	7.2 ± 0.4 ‡
	M	14.1 ± 0.3 ‡	13.4 ± 0.3 ‡	8.8 ± 0.6 *** ### ‡
Hct (%)	W	34.6 ± 0.9 ‡	34.5 ± 0.7 ‡	20.7 ± 1.2
	M	41.1 ± 0.8 ‡	39.8 ± 0.6 ‡	25.2 ± 1.9 *** ###
Structural remodeling				
Type I (%)	W	41.1 ± 2.3 ‡	31.8 ± 3.7	32.9 ± 1.9 ‡
	M	33.5 ± 1.5 ‡	34.5 ± 2.5	43.6 ± 4.0 * # ‡
Type I-IIa (%)	W	1.5 ± 0.7	0.8 ± 0.4	0.5 ± 0.2
	M	0.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.6 ± 1.0 #
Type IIa (%)	W	39.1 ± 2.1	44.0 ± 2.7	41.2 ± 2.8
	M	45.6 ± 2.4	45.6 ± 2.8	35.4 ± 2.5 * #
Type IIa-IIx (%)	W	7.8 ± 2.1	12.5 ± 4.0	11.0 ± 1.2 ‡
	M	13.1 ± 2.2	8.8 ± 1.4 †	6.3 ± 1.4 * ‡
Type IIx (%)	W	10.5 ± 2.4	10.8 ± 3.0	14.5 ± 2.7
	M	7.1 ± 2.1	11.1 ± 2.8	13.0 ± 3.7
Type I surface area (µm ²)	W	4,192 ± 320	4,121 ± 130	3,732 ± 318
	M	4,951 ± 225	4,429 ± 350	3,193 ± 414 ** #
Type I-IIa surface area (µm ²)	W	4,338 ± 587	2,626 ± 393	3,284 ± 657
	M	4,207 ± 683	3,879 ± 210	3,048 ± 149
Type IIa surface area (µm ²)	W	3,341 ± 298 ‡	3,244 ± 120 ‡	2,712 ± 203
	M	4,957 ± 283 ‡	5,038 ± 347 ‡	3,398 ± 271 ** ##
Type IIa-IIx surface area (µm ²)	W	2,581 ± 399 ‡	2,401 ± 318 ‡	2,366 ± 181
	M	3,937 ± 261 ‡	4,096 ± 470 ‡	3,261 ± 322
Type IIx surface area (µm ²)	W	2,214 ± 248 ‡	2,967 ± 313 ‡	2,433 ± 150
	M	3,825 ± 474 ‡	3,924 ± 461 ‡	2,956 ± 263
Surface area for 100 myocytes (mm ²)	W	371 ± 31	330 ± 13 ‡	298 ± 19
	M	452 ± 45	462 ± 30 ‡	302 ± 23 ** ##
% Fat	W	0.1 ± 0.09	0.7 ± 0.2 ‡	1.4 ± 0.3
	M	0.01 ± 0.01	0.047 ± 0.047 ‡	4.3 ± 2.3
Satellite cells	W	0.8 ± 0.1 ‡	1.5 ± 0.1 ‡	1.4 ± 0.2 ‡
	M	3.3 ± 0.5 ‡	5.2 ± 0.4** ‡	7.5 ± 0.2 *** ## ‡
CD 56 Fibers	W	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.06 ‡
	M	1.6 ± 0.8	1.3 ± 0.4	2.7 ± 0.9 ‡
Enzyme activities				
PFK	W	291 ± 13	303 ± 12	326 ± 13
	M	285.2 ± 9.6	306.0 ± 13.5	305.8 ± 11.3
LDH	W	882 ± 40	832 ± 35	811 ± 42
	M	852.2 ± 41.5	897.5 ± 44.1	794.3 ± 40.3
CK	W	1,851 ± 46	1,703 ± 78	1,607 ± 70
	M	1,822.4 ± 36	1,773 ± 50	1,568 ± 90 ** #
CS	W	19.9 ± 0.8	19.1 ± 1.1	15.5 ± 0.8
	M	20.7 ± 1.1	20.6 ± 0.8	14.2 ± 0.7 *** ###

β-HAD	W	16.4 ± 0.5	15.4 ± 1.3	13.1 ± 0.6
	M	17.6 ± 1.0	15.0 ± 0.7*	12.3 ± 0.7*** #
COx Type I	W	175 ± 4	181 ± 4	174 ± 3
	M	179 ± 3	183 ± 2	180 ± 4
Type IIa	W	140 ± 4 ‡	147 ± 4	143 ± 4
	M	156 ± 3 ‡	155 ± 4	145 ± 3 * \$
Type IIx	W	131 ± 3	128 ± 3	126 ± 3
	M	134 ± 3	123 ± 5 †	120 ± 3 *
Microvascular remodeling				
CD (cap/mm²)	W	412 ± 23 ‡	339 ± 23	223 ± 13 ‡
	M	343.5 ± 13.1 ‡	327.2 ± 8.1	278.7 ± 7.5 *** ## ‡
CAF	W	3.8 ± 0.3 ‡	3.4 ± 0.3 ‡	1.8 ± 0.1 ‡
	M	4.68 ± 0.21 ‡	4.15 ± 0.22 ‡	2.53 ± 0.11 *** ### ‡
COD (μm)	W	3.8 ± 0.3 ‡	5.2 ± 0.2 ‡	6.8 ± 0.3 ‡
	M	4,9 ± 0,1 ‡	6 ± 0,2 ‡	8,6 ± 0,6 ‡
LC/PF (%)	W	11.3 ± 1.0	8.1 ± 0.7	5.5 ± 0.3
	M	14.49 ± 0.82	13.50 ± 0.86 †	15.88 ± 0.76
CD x CSA (x1000)	W	8,432 ± 945 ‡	10,849 ± 727 ‡	12,288 ± 950 ‡
	M	15,573 ± 878 ‡	13,897 ± 616 ‡	18,010 ± 1,590 ## ‡
CapTor	W	1.973 ± 0.103 ‡	1.611 ± 0.035 ‡	1.558 ± 0.028
	M	2.77 ± 0.15 ‡	1.87 ± 0.07 *** ‡	1.57 ± 0.10 *** \$

Values are mean ± SE. W: women, M: men. ‡ Different between genders with P < .05. Other symbols: see Tables 1 and 2.

Figure Legends

Figure 1: Fiber type distribution and surface area in women

A: Fiber type distribution, B: Fiber surface area. Symbols: †: $0.05 < P < 0.1$, * $P < 0.05$.

Figure 2: Surface area for 100 myocytes in CON, SCT and SCA muscle

Representative surface area for 100 muscle fibers including fiber type distribution. Symbols: see Figure 1.

Figure 3: Capillary diameter distribution

A: Capillary outer diameter (μm), B: Capillary distribution in number, C: Relative capillary distribution (%). Symbols: **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$. Other symbols: see Figure 1.

Figures

Figure 1

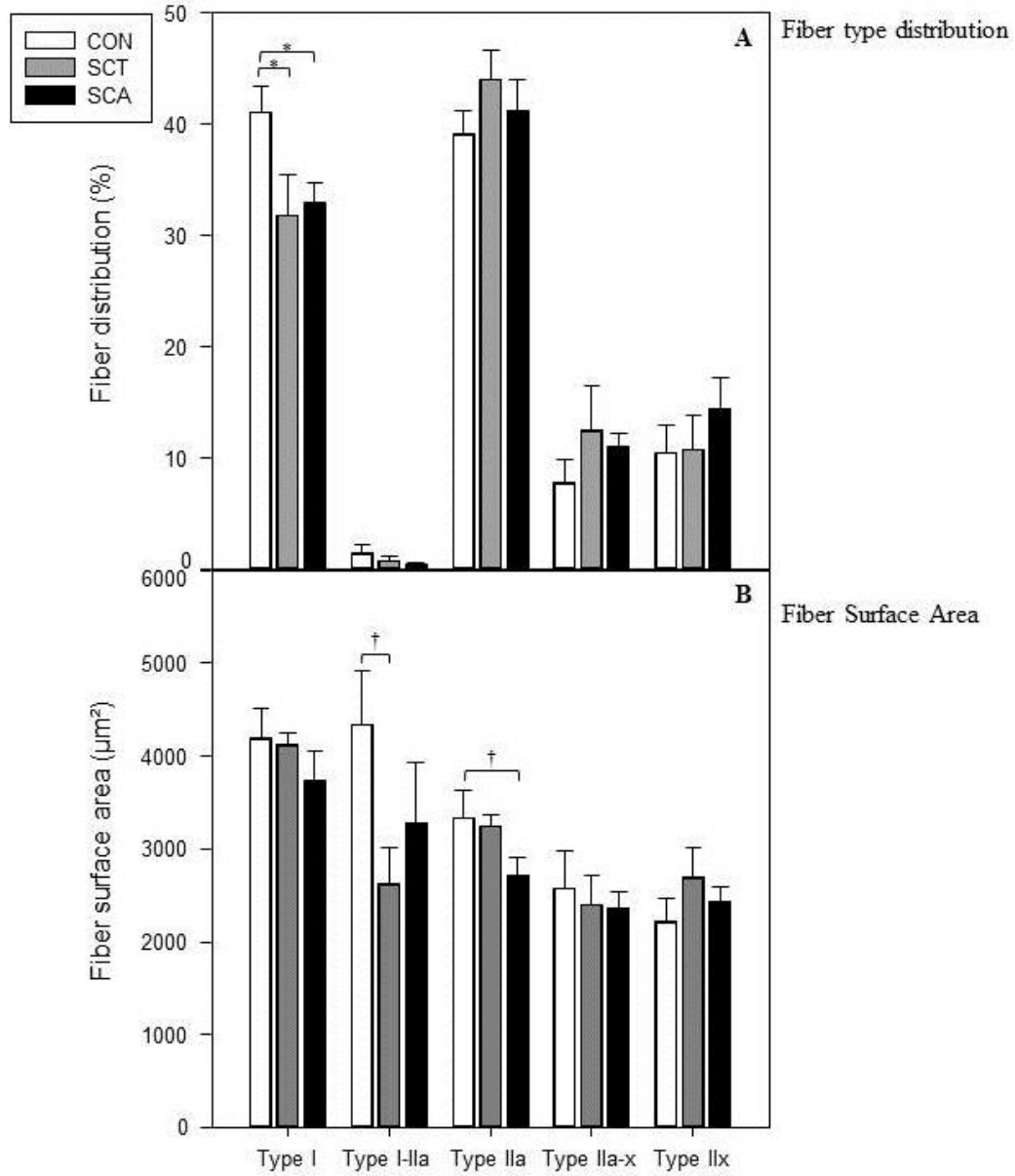
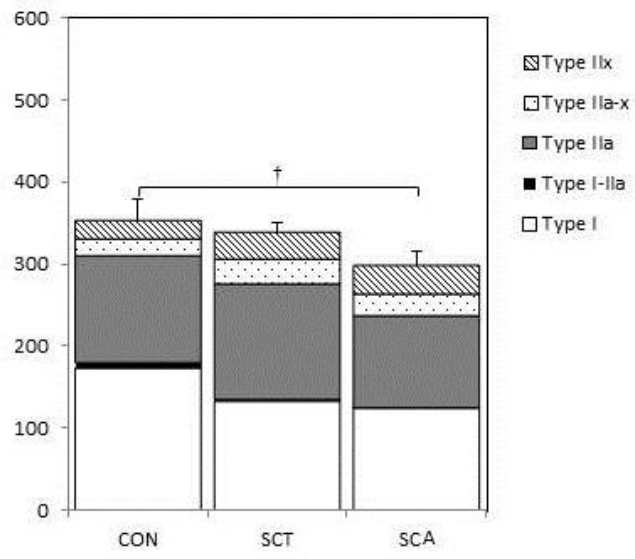
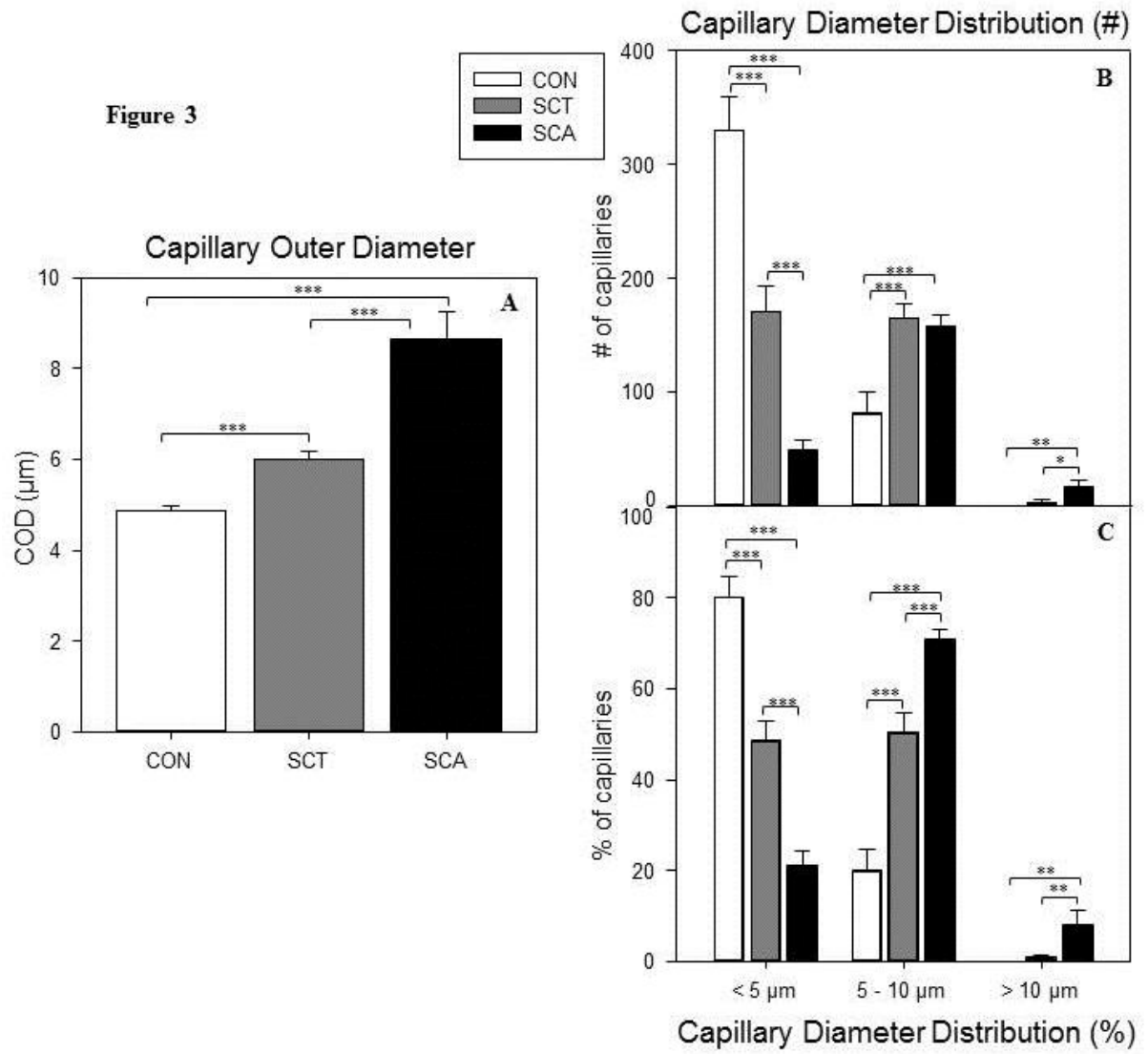


Figure 2





III. Discussion et Conclusion

III.1. Données anthropométriques et hématologiques

Cette population féminine étudiée est également assez homogène. Ces jeunes femmes étaient aussi étudiantes à l'Université de Yaoundé et vivaient dans le même contexte socio-économique que les hommes précédemment sollicités pour l'étude 1. En particulier, leur âge et leur taille ne diffèrent pas entre les trois groupes CON, SCT et SCA. Contrairement à la population masculine, nous n'observons pas de différence concernant le poids et l'IMC entre les trois groupes de femmes. Cependant, le fait qu'il n'y ait pas de différence de poids entre les femmes drépanocytaires et les femmes SCT et CON pourrait relever d'une sédentarité similaire entre ces trois groupes de sujets.

Les analyses hématologiques confirment le statut hémoglobinique de chacune des 29 participantes à l'étude. Les données du groupe homozygotes à la maladie confirment le caractère hémolytique de l'anémie chronique liée à la drépanocytose comme en témoigne le taux d'hémoglobine et le taux d'hématocrite très effondrés chez ces sujets (Tableau 1 de l'article 2). Alors que les deux autres groupes présentent des valeurs dans les limites de la norme. Le taux d'hémoglobine S chez les 9 sujets drépanocytaires est homogène, aux alentours de 78%.

III.2. Remodelage microvasculaire, structural et énergétique du muscle squelettique des femmes drépanocytaires

De façon globale, les résultats de cette étude 2 sont en cohérence avec ceux obtenus lors de l'étude 1 chez les hommes drépanocytaires (Ravelojaona *et al.*, Article 1). En effet, les résultats montrent que les femmes drépanocytaires présentent une amyotrophie et une diminution des activités CS et β -HAD, reflet d'une altération des capacités oxydatives. De plus, elles ont également subi un remodelage microvasculaire caractérisé par une diminution de la densité capillaire, une diminution de la tortuosité capillaire, et une augmentation du diamètre des microvaisseaux. Néanmoins, l'analyse plus approfondie de ces différents paramètres montre des modulations d'amplitude de variation potentiellement liées au genre au sein de ces tendances générales.

III.3. Effet genre

III.3.a. Données anthropométriques et hématologiques

Bien que les hommes drépanocytaires aient un poids et un IMC réduit par rapport aux hommes contrôles, il n'est en revanche pas retrouvé de différence significative pour ces paramètres entre les groupes féminins. Cependant, bien qu'il n'existe pas de différences significatives entre hommes et femmes de chaque groupe (CON, SCT et SCA), il ne faut pas tirer des conclusions trop hâtives concernant ces paramètres anthropométriques, notre population étant tout de même assez restreinte.

Par ailleurs, en accord avec la littérature (Jandl, 1987, West *et al.*, 1992, Steinberg *et al.*, 1995), il est retrouvé une population féminine plus anémique que la population masculine, avec un taux d'hémoglobine et un taux d'hématocrite inférieur chez les femmes CON, SCT et SCA par rapport à leurs contrôles respectifs masculins (diminutions de l'ordre de 15%). Les femmes drépanocytaires étant plus anémique, on retrouve un taux d'HbS total (Hb x HbS) significativement plus bas chez les femmes SCA par rapport aux hommes SCA ($P = 0.0167$, données non présentées). De plus, bien que non significatif mais en accord avec la littérature (Nagel et Ranney, 1990, Dover *et al.*, 1992, Steinberg *et al.*, 1995), les femmes drépanocytaires possèdent un taux moyen d'HbF 65% plus élevé que les hommes drépanocytaires.

III.3.b. Remodelage structural et énergétique

Bien qu'il n'y ait pas de différence significative entre les hommes et les femmes drépanocytaires concernant la surface occupée par 100 myocytes en prenant en compte la distribution typologique, on observe une amyotrophie de 20% chez les femmes SCA, alors que l'amyotrophie des hommes SCA est de 38% par rapport à leurs contrôles respectifs. De même, il est observé une altération du métabolisme oxydatif plus importante chez les hommes drépanocytaires, avec une diminution des activités β -HAD et CS d'environ 30%, alors que chez les femmes SCA ces diminutions sont d'environ 20%. En outre, l'activité COx dans les muscles féminins SCA n'est pas non plus une altérée contrairement à celle mesurée chez les hommes SCA (Ravelojaona *et al.*, Article 1).

Ces répercussions plus marquée chez les hommes drépanocytaires que chez leurs homologues femmes pourraient être dues à la différence de mode de vie entre les sexes dans cette population camerounaise, où les femmes restent plus souvent confinées au domicile et à s'occuper des tâches ménagères. Cette moindre amplitude de variation des données concernant l'amyotrophie et l'altération des capacités oxydatives entre drépanocytaires et

contrôles chez les femmes par rapport à celle observée chez les hommes, semble autant tenir d'une moindre réduction des valeurs moyennes des sujets SCA féminins (par rapport à leur contrôles), que de la faiblesse des valeurs moyennes mesurées chez ces contrôles femmes par rapport à celles de leurs homologues masculins.

Par ailleurs, on a vu précédemment que l'HbF a un rôle protecteur dans la drépanocytose, permettant de réduire les épisodes douloureux, de diminuer les complications (crises vaso-occlusives et syndrome thoracique aigu) et d'améliorer la survie (Platt *et al.*, 1991, Castro *et al.*, 1994, Platt *et al.*, 1994, Akinsheye *et al.*, 2011, Bhatnagar *et al.*, 2013). Or les femmes SCA ont un taux d'HbF plus important que les hommes SCA, ce qui pourrait en partie expliquer les répercussions structurales et énergétiques moins sévères chez les femmes drépanocytaires (Ravelojaona *et al.*, Article 1).

De plus, vu que les femmes drépanocytaires ont un taux d'HbS totale inférieur à celui des hommes SCA et que les répercussions musculaires sont fonction à la quantité d'HbS (Ravelojaona *et al.*, Article 1), il n'est pas surprenant d'observer de moindres répercussions sur le tissu musculaire féminin.

III.3.c. Remodelage microvasculaire

Les hommes et les femmes drépanocytaires subissent le même type de remodelage microvasculaire (diminution de la densité et de la tortuosité capillaire, et augmentation du diamètre des microvaisseaux) mais à des intensités variées selon les paramètres considérés.

Il a été observé que, lors d'angioplastie coronaire primaire, technique qui induit une reperfusion suite à une ischémie et mimant ainsi l'ischémie-reperfusion, les femmes présentaient moins de dommages microvasculaires que les hommes (Canali *et al.*, 2012). De ce fait, on pourrait s'attendre à un remodelage microvasculaire moins marqué chez les femmes SCA. Or ce n'est pas totalement le cas, puisque les femmes homozygotes à la maladie ont une diminution de la DC plus importante que les hommes SCA. Cependant, ce paradoxe pourrait être expliqué par la proportion plus importante de fibres musculaires de type I (fibres les plus vascularisées) chez les hommes que chez les femmes drépanocytaires (Hudlicka *et al.*, 1992). Une autre explication pourrait être une activité plus importante des métalloprotéinases matricielles (MMP), comme cela a été rapportée dans le muscle cardiaque de souris males par rapport à celui des souris femelles lors du remodelage consécutif à un infarctus aigu (Kolodgie *et al.*, 1997, Cavasin *et al.*, 2004). Puisque les MMP jouent un rôle dans l'angiogénèse (Carmeliet, 2000, Haas *et al.*, 2000, Conway *et al.*, 2001, Rivilis *et al.*, 2002), la diminution moins sévère de la DC chez les hommes SCA par rapport aux femmes

SCA pourrait être en partie expliquée par l'activité des MMP plus importante chez les hommes drépanocytaires. Enfin, la DC plus élevée chez les hommes drépanocytaires que les femmes drépanocytaires pourrait également être associée au pool de cellules satellites plus important observé chez les hommes SCA. En effet, il a été montré que l'activation de ces cellules pouvait favoriser l'angiogenèse (Abou-Khalil *et al.*, Christov *et al.*, 2007, Mounier *et al.*, 2011).

Par ailleurs, vu que les hommes SCA ont une DC plus élevée que les femmes SCA, alors qu'il n'y a pas de différence concernant la tortuosité des microvaisseaux, l'estimation de la surface d'échange théorique disponible entre le muscle et le sang pour les échanges gazeux et les métabolites (donnée par le produit $CD \times CP$) et l'estimation du volume sanguin par mm^2 dans la coupe de $10 \mu m$ (donnée par le produit $CD \times CSA$), sont moins affectées chez les hommes SCA que les femmes SCA.

Un élargissement des microvaisseaux a été aussi bien observé dans le muscle des hommes que des femmes drépanocytaires. Cependant, le diamètre moyen des microvaisseaux mesuré chez les hommes SCA ($8,6 \mu m$) est plus important que celui constaté chez les femmes SCA ($6,8 \mu m$), mais l'augmentation relative par rapport à leurs contrôles respectifs est identique (environ +75%). Etant donné que physiologiquement, les hommes ont un diamètre capillaire moyen plus élevé que les femmes (Hansen *et al.*, 1995, Lindekleiv *et al.*, 2010), ces résultats suggèrent que l'amplitude de l'élargissement des microvaisseaux lié à la drépanocytose est similaire pour les deux sexes.

Ces différences de répercussions musculaires entre les hommes et les femmes homozygotes à la maladie pourraient être en partie expliquées par l'influence des hormones sexuelles, les estrogènes. En effet, il a été montré dans l'artériosclérose que l'estrogène avait un rôle protecteur au niveau de la fonction endothéliale en induisant une augmentation de l'expression de la NO synthase et de la production basale endothéliale de NO (Hayashi *et al.*, 1992, Weiner *et al.*, 1994, Guetta *et al.*, 1997, Koh *et al.*, 1999). Or, il a été montré que le NO restreint la production des ROS et le phénomène d'ischémie-reperfusion (Node *et al.*, 1997, Gladwin *et al.*, 2003). Ainsi, grâce à leur taux d'estrogènes physiologiquement plus élevé, les femmes drépanocytaires ont un taux de NO supérieur aux hommes SCA, ce qui pourrait contribuer à minorer les répercussions musculaires chez elles. De même, ce taux plus élevé d'estrogènes réduit les répercussions des cardiopathies chez les femmes (Olivetti *et al.*, 1995, Kolodgie *et al.*, 1997, Canali *et al.*, 2012). L'effet protecteur conféré aux estrogènes sur l'ischémie-reperfusion (Versi, 1993, Delyani *et al.*, 1996, Node *et al.*, 1997, Booth *et al.*, 2008, Enns et Tiidus, 2010), rend les femmes plus résistantes que les hommes aux épisodes

itératifs d'ischémie (Versi, 1993). Si le phénomène d'ischémie-reperfusion est bien admis chez les patients drépanocytaires (Eltzschig et Eckle, 2011, Gladwin et Sachdev, 2012, Kaul *et al.*, 2013), on peut alors supposer que le muscle des femmes SCA soient plus tolérant à l'ischémie et qu'il bénéficie d'une meilleure reperfusion que celui des hommes SCA. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de vérifier si ce même effet genre est déjà perceptible avant la puberté, alors que les jeunes filles et les jeunes garçons présentent des taux d'estrogènes endogènes comparables, sous réserve que des perturbations du tissu musculaire, telles que nous les avons décrites, soient déjà observées à cet âge.

III.4. Conclusion

Les résultats de cette étude 2 ont montré que les femmes drépanocytaires subissent elles aussi, comme cela a été montré chez les hommes drépanocytaires lors de l'étude 1 (Ravelojaona *et al.*, Article 1), un remodelage microvasculaire, structural et énergétique sur leur tissu musculaire. Néanmoins, cette étude suggère également un effet lié au genre puisque le muscle des femmes SCA semble affecté par la drépanocytose dans une moindre proportion que celui des hommes SCA.

CONCLUSION

Avec l'augmentation constante du nombre de drépanocytaire en France, la drépanocytose va devenir un problème de santé publique.

Les répercussions de cette maladie sur certains organes et tissus sont très bien étudiées dans la littérature. Pourtant, alors que le muscle strié squelettique est le tissu le plus abondant du corps humain en représentant 40 à 50 % du poids corporel, aucune étude à ce jour n'avait été conduite sur l'impact de la drépanocytose sur le tissu. D'autant que les conséquences de cette maladie sur ce tissu pourraient être très délétères pour les patients SCA, notamment sur le plan de leur qualité de vie, laquelle dépend dans une grande mesure de la mobilité. Le travail doctoral qui a été conduit s'inscrivait dans cette perspective de décrire le plus précisément possible les répercussions musculaires de cette maladie génétique. Nos travaux concernant l'étude du muscle squelettique des hommes (étude 1) et des femmes (étude 2) dans la drépanocytose sont de ce point de vue pionniers.

Chez les hommes, nos résultats ont mis en évidence une amyotrophie, une altération de la typologie musculaire, une diminution des capacités oxydatives et une raréfaction et une fragilité du réseau microvasculaire.

Comme nous l'avons suggéré, les femmes drépanocytaires présentent une amyotrophie et une altération des capacités oxydatives moins marquées que les hommes drépanocytaires. En revanche, concernant le remodelage microvasculaire, malgré ces paramètres potentiellement « protecteurs » dont bénéficie la population féminine SCA, il est retrouvé une raréfaction plus prononcée du réseau microvasculaire dans le muscle des femmes SCA que dans celui des hommes SCA. Néanmoins, il semblerait que le tissu musculaire des femmes drépanocytaires soit globalement moins sévèrement affecté que celui des hommes SCA.

On peut noter que les répercussions musculaires observées sont associées à la proportion l'hémoglobine S. Ainsi, le muscle des sujets hétérozygotes présente un remodelage d'intensité intermédiaire par rapport à celles mesurées dans les muscles des sujets contrôles et homozygotes à la maladie. Cependant, les mécanismes sous-jacents du remodelage musculaire observé à la fois chez les hommes et les femmes SCA (et à moindre degré chez les sujets SCT) restent à ce jour inconnus.

Les répercussions musculaires pourraient potentiellement aggraver le phénotype clinique des sujets SCA. En effet, l'hypoxie et l'ischémie induites par la drépanocytose altèrent le métabolisme énergétique du muscle (Green *et al.*, 1992, Grassi *et al.*, 1996), ce qui conduit à une acidose, favorisant la désoxygénation de l'hémoglobine par l'effet Bohr, favorisant donc le processus de falciformation et éventuellement les crises vaso-occlusives. De plus, le stress oxydant, également présent dans la drépanocytose, est un paramètre connu

pour induire un remodelage énergétique du muscle squelettique (Koufen *et al.*, 1999, Remels *et al.*, 2010). D'autre part, les sujets SCA présentent des capacités fonctionnelles altérées, caractérisées par des diminutions de la force musculaire, de la consommation maximale en O₂ et du seuil lactique (ils présentent un lactate sanguin augmenté pour une même puissance sous-maximale) (Dougherty *et al.*, 2011, Waltz *et al.*, 2012b). Cette altération de la fonction du muscle incite davantage à adopter un style de vie sédentaire et renforce d'autant plus le déconditionnement physique de ces patients. Enfin, la moindre capacité fonctionnelle des sujets SCA affecte leur autonomie en limitant les possibilités d'emploi et en augmentant leur dépendance familiale et sociale, ce qui dégrade significativement leur qualité de vie.

PERSPECTIVES

Les études réalisées au cours de ce travail doctoral ont mis en évidence des résultats novateurs sur les caractéristiques musculaires des sujets drépanocytaires, nous incitant à approfondir nos observations.

Une étude de corrélations est actuellement en cours, concernant le taux d'HbS ou le taux d'Hb ou la teneur moyenne d'un globule rouge en HbS (HbS x TCMH) avec les différents paramètres étudiés. Cette étude devrait permettre de pointer l'importance de ces trois paramètres dans la maladie.

L'étude des cellules satellites nous paraît intéressante à approfondir compte tenu des modifications structurales manifestes subies par le muscle squelettique des sujets drépanocytaires. De façon générale, le muscle squelettique adulte humain est capable de se régénérer suite à une lésion grâce à ces cellules satellites, cellules souches myogéniques, résidant sous la lame basale des fibres musculaires (Mauro, 1961, Hawke et Garry, 2001). Lors d'une lésion, ces cellules quiescentes sont activées et prolifèrent afin de participer à la régénération musculaire post-lésionnelle. Les résultats que nous avons obtenus ont montré une augmentation du pool de cellules satellites proportionnelle au taux d'HbS circulant. Ainsi malgré une amyotrophie importante, le muscle des sujets drépanocytaires semblerait déclencher un processus de régénération. C'est pourquoi, nous envisageons d'approfondir l'étude de ces cellules satellites en déterminant le pourcentage d'activation de ce contingent cellulaire, leur localisation extra ou sous matricielle permettant d'appréhender la proportion de celles ayant quitté leur localisation physiologique à l'état de quiescence, leur éventuelle internalisation dans les fibres musculaires et selon les différents types de myocytes et leur maintien ou non au voisinage des microvaisseaux, respect ou non de la notion de niches vasculaires. Pour cela, le triple marquage Pax7, Ki67 et Mérosine en immunofluorescence accompagné du DAPI nous permettrait de mettre en évidence le caractère activé ou non des cellules satellites tout en précisant leur localisation. En effet, le DAPI est le marqueur de tous les noyaux, le Pax7 est le marqueur nucléaire reconnaissant les cellules satellites, la Mérosine permet d'identifier la lame basale du myocyte et donc de repérer la localisation extra- ou infra-matricielle d'une cellule satellite. Enfin le Ki67 est un marqueur de prolifération nucléaire, qui pourrait nous renseigner sur leur caractère activé ou non. La mise au point de ce triple marquage est actuellement en cours. Le marquage simultané Mérosine/Pax7 + DAPI est illustré par la figure 48) et la combinaison avec l'anticorps Ki67 reste à finaliser.

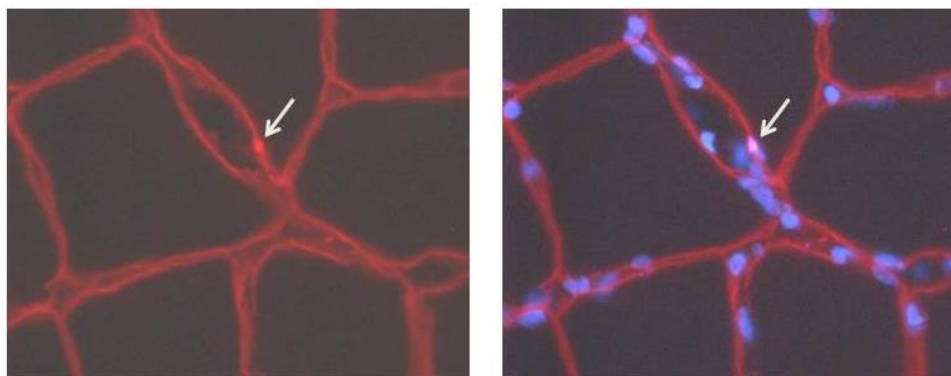


Figure 48 : Marquage en immunofluorescence d'une cellule satellite. Iconographie personnelle (LPE, Unité de Myologie, St Etienne).

A gauche : Pax7/Mérosine, à droite : Pax7/Mérosine + DAPI (en bleu). La flèche pointe une cellule satellite marquée à l'anticorps Pax7.

Par ailleurs, le muscle squelettique maintient sa masse musculaire grâce à la balance synthèse/dégradation des protéines. De ce fait, pour mieux appréhender la nature de l'amyotrophie, l'étude des activités enzymatiques protéolytiques pourrait être envisagée assortie de l'étude des voies de signalisation de synthèse protéique par des techniques enzymatiques par spectrofluorimétrie et de western blot.

Par ailleurs, afin d'approfondir les résultats obtenus au cours de ce travail doctoral, une prochaine étude en partenariat avec le CHU Henri Mondor à Créteil va consister à étudier l'influence d'une réadaptation progressive par l'exercice modéré chez le sujet drépanocytaire. La littérature rapporte une intolérance à l'effort et une force musculaire moindre chez les sujets SCA (Callahan *et al.*, 2002, Dougherty *et al.*, 2011). Bien que cela ne soit pas scientifiquement démontré, l'activité physique leur était jusqu'à présent déconseillée dans la crainte d'augmenter les crises vaso-occlusives. En effet, l'exercice est susceptible d'induire la polymérisation de l'HbS chez les sujets drépanocytaires car il est associé à un certain degré de déshydratation cellulaire, une acidose métabolique, un stress oxydant, des désordres hémorhéologiques (augmentation de la viscosité sanguine et altération des globules rouges), de l'inflammation et une hypoxie tissulaire. Cependant, il a été mis en évidence que la pratique régulière d'une activité physique d'intensité modérée semble être sans danger et même bénéfique pour le patient drépanocytaire (Waltz *et al.*, 2012a). Par ailleurs, de nombreuses études ont montré les effets bénéfiques sur le muscle, de l'entraînement dans la population sédentaire saine (Costes *et al.*, 2001, Charifi *et al.*, 2004). Ainsi, la thérapie par l'exercice pourrait être une alternative efficace pour améliorer les capacités musculaires,

diminuer les symptômes de la maladie et améliorer la qualité de vie des sujets drépanocytaires.

Pour déterminer l'intensité critique d'exercice pour laquelle l'activité musculaire conduit au phénomène de falciformation aboutissant aux crises vaso-occlusives, nous pourrions nous appuyer sur le modèle animal de souris drépanocytaires. Une récente étude sur le modèle de souris drépanocytaires SAD a montré que l'activité physique limitait l'activation endothéliale au niveau du poumon (Aufradet *et al.*, 2014). Nous pourrions étudier les effets de l'entraînement en endurance sur les caractéristiques musculaires et énergétiques selon différentes intensités d'exercice (stimulations à 20, 50 et 80% de la stimulation maximale téτανique). Des investigations sur l'oxygénation du muscle, l'acidose métabolique, les mécanismes impliqués dans la régulation du pH, les caractéristiques structurales et énergétiques du muscle, le remodelage microvasculaire, l'inflammation vasculaire et l'activation des cellules d'adhésion de l'endothélium pourraient être simultanément réalisées. De plus, afin de pouvoir transférer les résultats des expériences animales sur le protocole thérapie par exercice chez les sujets drépanocytaires, nous pourrions également envisager d'étudier sur un modèle de souris drépanocytaires l'effet de l'entraînement en endurance sur les caractéristiques musculaires énergétiques du muscle en utilisant un protocole d'ischémie-reperfusion. En se basant sur la récente étude réalisée sur le modèle de rats ischémiqυes qui a montré que l'exercice protégeait le cerveau des dommages ischémiqυes (Zhang *et al.*, 2014), il serait intéressant de vérifier si l'exercice restreint également les effets néfastes de l'ischémie-reperfusion rencontrée chez les sujets drépanocytaires.

Enfin, des mesures *in vivo* pourraient être réalisées afin de déterminer le débit sanguin musculaire et confirmer que celui-ci n'est pas diminué (Waltz *et al.*, 2012b). Ces perspectives sur le modèle animal font actuellement l'objet de la thèse de doctorat de Benjamin Chatel.

BIBLIOGRAPHIE

- Abou-Khalil, R., R. Mounier and B. Chazaud** "Regulation of myogenic stem cell behavior by vessel cells: the "menage a trois" of satellite cells, periendothelial cells and endothelial cells." *Cell Cycle* **9**(5): 892-896.
- Adachi, K. and T. Asakura (1984).** "Polymerization of AS hybrid hemoglobin. Potent inhibitory effect of hemoglobin A on the polymerization of AS hybrid hemoglobin." *J Biol Chem* **259**(4): 2108-2112.
- Adebayo, R. A., M. O. Balogun, N. O. Akinola and A. O. Akintomide (2002).** "Cardiovascular changes in sickle cell anaemia." *Niger J Med* **11**(4): 145-152.
- Adhihetty, P. J., M. F. O'Leary, B. Chabi, K. L. Wicks and D. A. Hood (2007).** "Effect of denervation on mitochondrially mediated apoptosis in skeletal muscle." *J Appl Physiol (1985)* **102**(3): 1143-1151.
- Ahmed, S., R. K. Shahid and L. A. Russo (2005).** "Unusual causes of abdominal pain: sickle cell anemia." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **19**(2): 297-310.
- Akinsheye, I., A. Alsultan, N. Solovieff, D. Ngo, C. T. Baldwin, P. Sebastiani, D. H. Chui and M. H. Steinberg (2011).** "Fetal hemoglobin in sickle cell anemia." *Blood* **118**(1): 19-27.
- Ama, P. F., J. A. Simoneau, M. R. Boulay, O. Serresse, G. Theriault and C. Bouchard (1986).** "Skeletal muscle characteristics in sedentary black and Caucasian males." *J Appl Physiol* **61**(5): 1758-1761.
- Andersen, P. (1975).** "Capillary density in skeletal muscle of man." *Acta Physiol Scand* **95**(2): 203-205.
- Anzalone, M. L., V. S. Green, M. Buja, L. A. Sanchez, R. I. Harrykisson and R. Eichner (2010).** "Sickle cell trait and fatal rhabdomyolysis in football training: a case study." *Med Sci Sports Exerc* **42**: 3-7.
- Asdourian, G. K., K. C. Nagpal, B. Busse, M. Goldbaum, D. Patriankos, M. F. Rabb and M. F. Goldberg (1976).** "Macular and perimacular vascular remodelling sickling haemoglobinopathies." *Br J Ophthalmol* **60**(6): 431-453.
- Ashcroft, M. T., G. R. Serjeant and P. Desai (1972).** "Heights, weights, and skeletal age of Jamaican adolescents with sickle cell anaemia." *Arch Dis Child* **47**(254): 519-524.
- Aslan, M., T. M. Ryan, B. Adler, T. M. Townes, D. A. Parks, J. A. Thompson, A. Tousson, M. T. Gladwin, R. P. Patel, M. M. Tarpey, I. Batinic-Haberle, C. R. White and B. A. Freeman (2001).** "Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26): 15215-15220.
- Aufradet, E., A. Douillard, E. Charrin, A. Romdhani, G. De Souza, A. Bessaad, C. Faes, V. Bourgeaux, E. N. Chirico, E. Canet-Soulas, V. Pialoux and C. Martin (2014).** "Physical activity limits pulmonary endothelial activation in sickle cell SAD mice." *Blood* **123**(17): 2745-2747.
- Bachir, D. (2000).** "La drépanocytose." *Revue Française des Laboratoires*(324).

- Ballas, S. K. and N. Mohandas (2004).** "Sickle red cell microrheology and sickle blood rheology." *Microcirculation* **11**(2): 209-225.
- Barabino, G. A., M. O. Platt and D. K. Kaul (2010).** "Sickle cell biomechanics." *Annu Rev Biomed Eng* **12**: 345-367.
- Bardakdjian, J., Wajcman, H. (2004).** "Epidémiologie de la drépanocytose." *La Revue du Practicien* **54**: 1531-1533.
- Baudon, J.-J. (2009).** "Crises aiguës drépanocytaires." *Journal International de Médecine*.
- Baum, K. F., D. T. Dunn, G. H. Maude and G. R. Serjeant (1987).** "The painful crisis of homozygous sickle cell disease. A study of the risk factors." *Arch Intern Med* **147**(7): 1231-1234.
- Becklake, M. R., S. B. Griffiths, G. M. Mc, H. I. Goldman and J. P. Schreve (1955).** "Oxygen dissociation curves in sickle cell anemia and in subjects with the sickle cell trait." *J Clin Invest* **34**(5): 751-755.
- Benesch, R. E., R. Edalji, S. Kwong and R. Benesch (1978).** "Oxygen affinity as an index of hemoglobin S polymerization: a new micromethod." *Anal Biochem* **89**(1): 162-173.
- Berger, S. A. and W. S. King (1980).** "The flow of sickle-cell blood in the capillaries." *Biophys J* **29**(1): 119-148.
- Bergeron, M. F., J. G. Cannon, E. L. Hall and A. Kutlar (2004).** "Erythrocyte sickling during exercise and thermal stress." *Clin J Sport Med* **14**(6): 354-356.
- Bernard, J., J. P. Levy, B. Varet, J. P. Claudel, J. D. Rain and Y. Sultan (1998).** *Hématologie*. Paris, Abrégé Masson. 9^{ème} édition.
- Bessis, M. and G. Delpech (1982).** "Sickle cell shape and structure: images and concepts (1840-1980)." *Blood Cells* **8**(2): 359-435.
- Bhatnagar, P., J. R. Keefer, J. F. Casella, E. A. Barron-Casella, C. J. Bean, C. W. Hooper, A. B. Payne, D. E. Arking and M. R. Debaun (2013).** "Association between baseline fetal hemoglobin levels and incidence of severe vaso-occlusive pain episodes in children with sickle cell anemia." *Pediatr Blood Cancer* **60**(10): E125-127.
- Bile, A., D. Le Gallais, B. Mercier, P. Martinez, S. Ahmaidi and C. Prefaut (1996).** "Anaerobic exercise components during the force-velocity test in sickle cell trait." *Int J Sports Med* **17**(4): 254-258.
- Bile, A., D. Le Gallais, J. Mercier, P. Bogui and C. Prefaut (1998).** "Sickle cell trait in Ivory Coast athletic throw and jump champions, 1956-1995." *Int J Sports Med* **19**(3): 215-219.
- Bloor, C. M. (2005).** "Angiogenesis during exercise and training." *Angiogenesis* **8**(3): 263-271.

- Bookchin, R. M., T. Balazs and L. C. Landau (1976).** "Determinants of red cell sickling. Effects of varying pH and of increasing intracellular hemoglobin concentration by osmotic shrinkage." *J Lab Clin Med* **87**(4): 597-616.
- Booth, E. A., R. R. Flint, K. L. Lucas, A. K. Knittel and B. R. Lucchesi (2008).** "Estrogen protects the heart from ischemia-reperfusion injury via COX-2-derived PGI₂." *J Cardiovasc Pharmacol* **52**(3): 228-235.
- Breen, E., K. Tang, M. Olfert, A. Knapp and P. Wagner (2008).** "Skeletal muscle capillarity during hypoxia: VEGF and its activation." *High Alt Med Biol* **9**(2): 158-166.
- Brooke, M. H. and K. K. Kaiser (1970).** "Muscle fiber types: how many and what kind?" *Arch Neurol* **23**(4): 369-379.
- Buchowski, M. S., K. M. Townsend, R. Williams and K. Y. Chen (2002).** "Patterns and energy expenditure of free-living physical activity in adolescents with sickle cell anemia." *J Pediatr* **140**(1): 86-92.
- Callahan, L. A., K. F. Woods, G. A. Mensah, L. T. Ramsey, P. Barbeau and B. Gutin (2002).** "Cardiopulmonary responses to exercise in women with sickle cell anemia." *Am J Respir Crit Care Med* **165**(9): 1309-1316.
- Callender, S. T., E. O. Powell and L. J. Witts (1947).** "Normal red-cell survival in men and women." *J Pathol Bacteriol* **59**(4): 519-532.
- Campbell, N. A. and J. B. Reece (2005).** *Biology Seventh Edition*. San Francisco, CA, USA, Pearson Education, Inc., Benjamin Cummings.
- Canali, E., P. Masci, J. Bogaert, C. Bucciarelli Ducci, M. Francone, E. McAlindon, I. Carbone, M. Lombardi, W. Desmet, S. Janssens and L. Agati (2012).** "Impact of gender differences on myocardial salvage and post-ischaemic left ventricular remodelling after primary coronary angioplasty: new insights from cardiovascular magnetic resonance." *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* **13**(11): 948-953.
- Carmeliet, P. (2000).** "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." *Nat Med* **6**(4): 389-395.
- Castro, O., D. J. Brambilla, B. Thorington, C. A. Reindorf, R. B. Scott, P. Gillette, J. C. Vera and P. S. Levy (1994).** "The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease." *Blood* **84**(2): 643-649.
- Cavasin, M. A., Z. Tao, S. Menon and X. P. Yang (2004).** "Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice." *Life Sci* **75**(18): 2181-2192.
- Charifi, N. (2006).** Effets du vieillissement sur la population des cellules satellites et la microvascularisation du muscle squelettique humain. Adaptations à l'entraînement en endurance chez le sujet âgé. Thèse de Doctorat, Université Jean Monnet, Saint Etienne.
- Charifi, N., F. Kadi, L. Feasson, F. Costes, A. Geysant and C. Denis (2004).** "Enhancement of microvessel tortuosity in the vastus lateralis muscle of old men in response to endurance training." *J Physiol* **554**(Pt 2): 559-569.

- Chaves, M. A., M. S. Leonart and A. J. do Nascimento (2008).** "Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S." *Hematology* **13**(3): 187-192.
- Chiang, E. Y. and P. S. Frenette (2005).** "Sickle cell vaso-occlusion." *Hematol Oncol Clin North Am* **19**(5): 771-784, v.
- Christov, C., F. Chretien, R. Abou-Khalil, G. Bassez, G. Vallet, F. J. Authier, Y. Bassaglia, V. Shinin, S. Tajbakhsh, B. Chazaud and R. K. Gherardi (2007).** "Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners." *Mol Biol Cell* **18**(4): 1397-1409.
- Chung, A. S. and N. Ferrara (2010).** "The extracellular matrix & angiogenesis: Role of the extracellular matrix in developing vessels and tumor angiogenesis." *Pathways*(11): 2-5.
- Connes, P., S. Racinais, F. Sra, L. Marlin, C. Hertogh, C. Saint-Martin, E. Etienne-Julan and O. Hue (2006a).** "Does the pattern of repeated sprint ability differ between sickle cell trait carriers and healthy subjects." *Int J Sports Med* **27**(12): 937-942.
- Connes, P., F. Sara, M. D. Hardy-Dessources, L. Marlin, F. Etienne, L. Larifla, C. Saint-Martin and O. Hue (2006b).** "Effects of short supramaximal exercise on hemorheology in sickle cell trait carriers." *Eur J Appl Physiol* **97**(2): 143-150.
- Conway, E. M., D. Collen and P. Carmeliet (2001).** "Molecular mechanisms of blood vessel growth." *Cardiovasc Res* **49**(3): 507-521.
- Costes, F., F. Prieur, L. Feasson, A. Geysant, J. C. Barthelemy and C. Denis (2001).** "Influence of training on NIRS muscle oxygen saturation during submaximal exercise." *Med Sci Sports Exerc* **33**(9): 1484-1489.
- de Montalembert, M., M. Maier-Redelsperger, R. Girot, M. Belloy, E. Vilmer, R. Ducrocq, C. Guidal and J. Elion (1993).** "Beta-globin gene cluster haplotype and alpha-thalassemia do not correlate with the acute clinical manifestations of sickle cell disease in children." *Blood* **82**(8): 2595-2596.
- de Theije, C., F. Costes, R. C. Langen, C. Pison and H. R. Gosker (2011).** "Hypoxia and muscle maintenance regulation: implications for chronic respiratory disease." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **14**(6): 548-553.
- Delet, A. (2008).** Carcatérisation histologique des répercussions musculaires de la drépanocytose. Master 2 Recherche, Université Jean Monnet, Saint Etienne.
- Delyani, J. A., T. Murohara, T. O. Nossuli and A. M. Lefer (1996).** "Protection from myocardial reperfusion injury by acute administration of 17 beta-estradiol." *J Mol Cell Cardiol* **28**(5): 1001-1008.
- Di Giovanni, S., M. Mirabella, M. Papacci, F. Odoardi, G. Silvestri and S. Servidei (2001).** "Apoptosis and ROS detoxification enzymes correlate with cytochrome c oxidase deficiency in mitochondrial encephalomyopathies." *Mol Cell Neurosci* **17**(4): 696-705.
- Diggs, L., Ahmann, CF., Bibbs, J. (1933).** "The incidence and the significance of the sickle cell trait." *Annals of Internal Medicine* **7**: 769-778.

- Dougherty, K. A., J. I. Schall, A. J. Rovner, V. A. Stallings and B. S. Zemel (2011).** "Attenuated maximal muscle strength and peak power in children with sickle cell disease." *J Pediatr Hematol Oncol* **33**(2): 93-97.
- Dover, G. J., K. D. Smith, Y. C. Chang, S. Purvis, A. Mays, D. A. Meyers, C. Sheils and G. Serjeant (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.
- Dubowitz, V., Sewry, CA (2007).** *Muscle Biopsy A practical Approach*.
- Eaton, W. A. and J. Hofrichter (1987).** "Hemoglobin S gelation and sickle cell disease." *Blood* **70**(5): 1245-1266.
- Egginton, S. (2009).** "Invited review: activity-induced angiogenesis." *Pflugers Arch* **457**(5): 963-977.
- Ejindu, V. C., A. L. Hine, M. Mashayekhi, P. J. Shorvon and R. R. Misra (2007).** "Musculoskeletal manifestations of sickle cell disease." *Radiographics* **27**(4): 1005-1021.
- El-Sayed, M. and M. Ramadan (2004).** "Immunohistochemical study of some rare vascular tumors." *J Egypt Natl Canc Inst* **16**(2): 123-129.
- Elbaum, D. and R. L. Nagel (1981).** "Esterase activity of hemoglobin. Differences between HB A and HB S." *J Biol Chem* **256**(5): 2280-2283.
- Eltzschig, H. K. and T. Eckle (2011).** "Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation." *Nat Med* **17**(11): 1391-1401.
- Enns, D. L. and P. M. Tiidus (2010).** "The influence of estrogen on skeletal muscle: sex matters." *Sports Med* **40**(1): 41-58.
- Eriksson, E. and R. Myrhage (1972).** "Microvascular dimensions and blood flow in skeletal muscle." *Acta Physiol Scand* **86**(2): 211-222.
- Feasson, L., V. Gautheron, J. Mosnier, J. Antoine, G. Damon, D. Michel and C. Denis (1997).** "Intérêt de la biopsie musculaire à la pince dans le diagnostic étiologique des pathologies neuromusculaires." *Annales de Réadaptation et de Médecine Physique* **40**: 527-533.
- Feasson, L., D. Stockholm, D. Freyssenet, I. Richard, S. Duguez, J. S. Beckmann and C. Denis (2002).** "Molecular adaptations of neuromuscular disease-associated proteins in response to eccentric exercise in human skeletal muscle." *J Physiol* **543**(Pt 1): 297-306.
- Fitts, R. H., D. R. Riley and J. J. Widrick (2001).** "Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity." *J Exp Biol* **204**(Pt 18): 3201-3208.
- Francis, R. B., Jr. and C. S. Johnson (1991).** "Vascular occlusion in sickle cell disease: current concepts and unanswered questions." *Blood* **77**(7): 1405-1414.
- Galactéros, F. (1996).** "[Neonatal detection of sickle cell disease in metropolitan France. Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant (AFDPHE)]." *Arch Pediatr* **3**(10): 1026-1031.

Galactéros, F. (2000). Drépanocytose. *Orphanet*. N. Casadevall.

Genet, S., R. K. Kale and N. Z. Baquer (2000). "Effects of free radicals on cytosolic creatine kinase activities and protection by antioxidant enzymes and sulfhydryl compounds." *Mol Cell Biochem* **210**(1-2): 23-28.

Giroto, R. (1994). Les syndrômes thalassémiques et les syndrômes drépanocytaires, aspects cliniques et thérapeutiques. *Hématologie*. **Tome I**: 345-354.

Giroto, R., P. Bégué and F. Galacteros (2003). *La Drépanocytose*. Montrouge, France.

Gladwin, M. T., J. H. Crawford and R. P. Patel (2004a). "The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation." *Free Radic Biol Med* **36**(6): 707-717.

Gladwin, M. T. and V. Sachdev (2012). "Cardiovascular abnormalities in sickle cell disease." *J Am Coll Cardiol* **59**(13): 1123-1133.

Gladwin, M. T., V. Sachdev, M. L. Jison, Y. Shizukuda, J. F. Plehn, K. Minter, B. Brown, W. A. Coles, J. S. Nichols, I. Ernst, L. A. Hunter, W. C. Blackwelder, A. N. Schechter, G. P. Rodgers, O. Castro and F. P. Ognibene (2004b). "Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease." *N Engl J Med* **350**(9): 886-895.

Gladwin, M. T. and A. N. Schechter (2001). "Nitric oxide therapy in sickle cell disease." *Semin Hematol* **38**(4): 333-342.

Gladwin, M. T., A. N. Schechter, F. P. Ognibene, W. A. Coles, C. D. Reiter, W. H. Schenke, G. Csako, M. A. Waclawiw, J. A. Panza and R. O. Cannon, 3rd (2003). "Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease." *Circulation* **107**(2): 271-278.

Gladwin, M. T., J. H. Shelhamer, F. P. Ognibene, M. E. Pease-Fye, J. S. Nichols, B. Link, D. B. Patel, M. A. Jankowski, L. K. Pannell, A. N. Schechter and G. P. Rodgers (2002). "Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease." *Br J Haematol* **116**(2): 436-444.

Gosker, H. R., B. Kubat, G. Schaart, G. J. van der Vusse, E. F. Wouters and A. M. Schols (2003). "Myopathological features in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Eur Respir J* **22**(2): 280-285.

Granata, S., G. Zaza, S. Simone, G. Villani, D. Latorre, P. Pontrelli, M. Carella, F. P. Schena, G. Grandaliano and G. Pertosa (2009). "Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease." *BMC Genomics* **10**: 388.

Grassi, B., M. Marzorati, B. Kayser, M. Bordini, A. Colombini, M. Conti, C. Marconi and P. Cerretelli (1996). "Peak blood lactate and blood lactate vs. workload during acclimatization to 5,050 m and in deacclimatization." *J Appl Physiol (1985)* **80**(2): 685-692.

Green, H. J., J. R. Sutton, E. E. Wolfel, J. T. Reeves, G. E. Butterfield and G. A. Brooks (1992). "Altitude acclimatization and energy metabolic adaptations in skeletal muscle during exercise." *J Appl Physiol (1985)* **73**(6): 2701-2708.

- Griffiths, A. J. F., J. H. Miller, D. T. Suzuki, R. C. Lewontin and W. M. Gelbart (2000).** *Introduction to Genetic Analysis*. New York, W. H. Freeman; Seventh Edition edition.
- Guetta, V., A. A. Quyyumi, A. Prasad, J. A. Panza, M. Waclawiw and R. O. Cannon, 3rd (1997).** "The role of nitric oxide in coronary vascular effects of estrogen in postmenopausal women." *Circulation* **96**(9): 2795-2801.
- Gute, D. C., T. Ishida, K. Yarimizu and R. J. Korthuis (1998).** "Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle." *Mol Cell Biochem* **179**(1-2): 169-187.
- Haas, T. L., M. Milkiewicz, S. J. Davis, A. L. Zhou, S. Egginton, M. D. Brown, J. A. Madri and O. Hudlicka (2000).** "Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**(4): H1540-1547.
- Habibi, A., Bachir, D., Godeau, B. (2004).** "Complication aiguës de la drépanocytose." *La Revue du Practicien* **54**: 1548-1556.
- Hansen-Smith, F. M., L. Watson, D. Y. Lu and I. Goldstein (1988).** "Griffonia simplicifolia I: fluorescent tracer for microcirculatory vessels in nonperfused thin muscles and sectioned muscle." *Microvasc Res* **36**(3): 199-215.
- Hansen, F., P. Mangell, B. Sonesson and T. Lanne (1995).** "Diameter and compliance in the human common carotid artery--variations with age and sex." *Ultrasound Med Biol* **21**(1): 1-9.
- Harrelson, G. L., A. L. Fincher and J. B. Robinson (1995).** "Acute exertional rhabdomyolysis and its relationship to sickle cell trait." *J Athl Train* **30**(4): 309-312.
- Hawke, T. J. and D. J. Garry (2001).** "Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology." *J Appl Physiol* **91**(2): 534-551.
- Hayashi, T., J. M. Fukuto, L. J. Ignarro and G. Chaudhuri (1992).** "Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(23): 11259-11263.
- Hebbel, R. P. (1997).** "Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium." *J Clin Invest* **100**(11 Suppl): S83-86.
- Hebbel, R. P., M. A. Boogaerts, J. W. Eaton and M. H. Steinberg (1980a).** "Erythrocyte adherence to endothelium in sickle-cell anemia. A possible determinant of disease severity." *N Engl J Med* **302**(18): 992-995.
- Hebbel, R. P., M. A. Boogaerts, S. Koresawa, H. S. Jacob, J. W. Eaton and M. H. Steinberg (1980b).** "Erythrocyte adherence to endothelium as a determinant of vasocclusive severity in sickle cell disease." *Trans Assoc Am Physicians* **93**: 94-99.
- Hebbel, R. P., A. Leung and N. Mohandas (1990).** "Oxidation-induced changes in microrheologic properties of the red blood cell membrane." *Blood* **76**(5): 1015-1020.
- Hebbel, R. P., O. Yamada, C. F. Moldow, H. S. Jacob, J. G. White and J. W. Eaton (1980c).** "Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium:

possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease." *J Clin Invest* **65**(1): 154-160.

Hepple, R. T. (1997). "A new measurement of tissue capillarity: the capillary-to-fibre perimeter exchange index." *Can J Appl Physiol* **22**(1): 11-22.

Hermansen, L. and M. Wachtlova (1971). "Capillary density of skeletal muscle in well-trained and untrained men." *J Appl Physiol* **30**(6): 860-863.

Herrick, J. B. (1910). "Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia." *Arch Intern Med* **6**: 517-521.

Hirvonen, J., S. Rehunen, H. Rusko and M. Harkonen (1987). "Breakdown of high-energy phosphate compounds and lactate accumulation during short supramaximal exercise." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **56**(3): 253-259.

Hofrichter, J., P. D. Ross and W. A. Eaton (1974). "Kinetics and mechanism of deoxyhemoglobin S gelation: a new approach to understanding sickle cell disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**(12): 4864-4868.

Hoover, R., R. Rubin, G. Wise and R. Warren (1979). "Adhesion of normal and sickle erythrocytes to endothelial monolayer cultures." *Blood* **54**(4): 872-876.

Hoppeler, H. (1984). Morphometry of skeletal muscle capillaries. *Skeletal Muscle Microcirculation*. F. M. Hammersen. Basel, Karger: 33-43.

Hoppeler, H. and M. Fluck (2003). "Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function." *Med Sci Sports Exerc* **35**(1): 95-104.

Hoppeler, H. and M. Vogt (2001). "Muscle tissue adaptations to hypoxia." *J Exp Biol* **204**(Pt 18): 3133-3139.

Horak, E. R., R. Leek, N. Klenk, S. LeJeune, K. Smith, N. Stuart, M. Greenall, K. Stepniewska and A. L. Harris (1992). "Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer." *Lancet* **340**(8828): 1120-1124.

Howald, H., D. Pette, J. A. Simoneau, A. Uber, H. Hoppeler and P. Cerretelli (1990). "Effect of chronic hypoxia on muscle enzyme activities." *Int J Sports Med* **11 Suppl 1**: S10-14.

Hudlicka, O., M. Brown and S. Egginton (2004). Microcirculation in muscle. *Myology: Basic and Clinical*. A. B. F.-A. Engel, C. . New York, McGraw-Hill. 3rd Edition.

Hudlicka, O., M. Brown and S. Egginton (1992). "Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle." *Physiol Rev* **72**(2): 369-417.

Hue, O., M. E. Julan, S. Blanc, S. Martin, C. Hertogh, L. Marlin, C. Pallud and D. Le Gallais (2002). "Alactic anaerobic performance in subjects with sickle cell trait and hemoglobin AA." *Int J Sports Med* **23**(3): 174-177.

- Ikuta, T., S. Ausenda and M. D. Cappellini (2001).** "Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1847-1852.
- Ingram, V. M. (1956).** "A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin." *Nature* **178**(4537): 792-794.
- Jackson, J. F., J. L. Odom and W. N. Bell (1961).** "Amelioration of sickle cell disease by persistent fetal hemoglobin." *JAMA* **177**: 867-869.
- Jandl, J. (1987).** *Blood: Textbook of Hematology*. Boston, Little Brown & Co.
- Jones, D., Round, J., de Haan, A. (2005).** *Physiologie du muscle squelettique*, Elsevier.
- Jones, S. R., R. A. Binder and E. M. Donowho, Jr. (1970).** "Sudden death in sickle-cell trait." *N Engl J Med* **282**(6): 323-325.
- Kadi, F. (2000).** "Adaptation of human skeletal muscle to training and anabolic steroids." *Acta Physiol Scand Suppl* **646**: 1-52.
- Kadi, F., N. Charifi, C. Denis and J. Lexell (2004a).** "Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men." *Muscle Nerve* **29**(1): 120-127.
- Kadi, F., P. Schjerling, L. L. Andersen, N. Charifi, J. L. Madsen, L. R. Christensen and J. L. Andersen (2004b).** "The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles." *J Physiol* **558**(Pt 3): 1005-1012.
- Kalluri, R. (2003).** "Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis." *Nat Rev Cancer* **3**(6): 422-433.
- Kark, J. A., D. M. Posey, H. R. Schumacher and C. J. Ruehle (1987).** "Sickle-cell trait as a risk factor for sudden death in physical training." *N Engl J Med* **317**(13): 781-787.
- Kato, G. J., M. T. Gladwin and M. H. Steinberg (2007).** "Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes." *Blood Rev* **21**(1): 37-47.
- Kato, G. J., R. P. Hebbel, M. H. Steinberg and M. T. Gladwin (2009).** "Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions." *Am J Hematol* **84**(9): 618-625.
- Kato, G. J., M. Hsieh, R. Machado, J. t. Taylor, J. Little, J. A. Butman, T. Lehky, J. Tisdale and M. T. Gladwin (2006).** "Cerebrovascular disease associated with sickle cell pulmonary hypertension." *Am J Hematol* **81**(7): 503-510.
- Kaul, D. K., M. E. Fabry, S. M. Suzuka and X. Zhang (2013).** "Antisickling fetal hemoglobin reduces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in normoxic sickle mice: microvascular implications." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **304**(1): H42-50.
- Kaul, D. K. and R. P. Hebbel (2000).** "Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice." *J Clin Invest* **106**(3): 411-420.

- Kaul, D. K., X. D. Liu, X. Zhang, L. Ma, C. J. Hsia and R. L. Nagel (2006).** "Inhibition of sickle red cell adhesion and vasoocclusion in the microcirculation by antioxidants." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**(1): H167-175.
- Kaul, D. K. and R. L. Nagel (1993).** "Sickle cell vasoocclusion: many issues and some answers." *Experientia* **49**(1): 5-15.
- Kawada, S. and N. Ishii (2008).** "Changes in skeletal muscle size, fibre-type composition and capillary supply after chronic venous occlusion in rats." *Acta Physiol (Oxf)* **192**(4): 541-549.
- Koh, K. K., A. Blum, L. Hathaway, R. Mincemoyer, G. Csako, M. A. Waclawiw, J. A. Panza and R. O. Cannon, 3rd (1999).** "Vascular effects of estrogen and vitamin E therapies in postmenopausal women." *Circulation* **100**(18): 1851-1857.
- Kolodgie, F. D., A. Farb, S. H. Litovsky, J. Narula, L. A. Jeffers, S. J. Lee and R. Virmani (1997).** "Myocardial protection of contractile function after global ischemia by physiologic estrogen replacement in the ovariectomized rat." *J Mol Cell Cardiol* **29**(9): 2403-2414.
- Koufen, P., A. Ruck, D. Brdiczka, S. Wendt, T. Wallimann and G. Stark (1999).** "Free radical-induced inactivation of creatine kinase: influence on the octameric and dimeric states of the mitochondrial enzyme (Mib-CK)." *Biochem J* **344 Pt 2**: 413-417.
- Labie, D. and J. Elion (2005).** "Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine." *EMC-Hématologie* **2**: 220-239.
- Lande, W. M., D. L. Andrews, M. R. Clark, N. V. Braham, D. M. Black, S. H. Embury and W. C. Mentzer (1988).** "The incidence of painful crisis in homozygous sickle cell disease: correlation with red cell deformability." *Blood* **72**(6): 2056-2059.
- Le Gallais, D., C. Prefaut, J. Mercier, A. Bile, P. Bogui and J. Lonsdorfer (1994).** "Sickle cell trait as a limiting factor for high-level performance in a semi-marathon." *Int J Sports Med* **15**(7): 399-402.
- Lehninger, A. (1979).** *Biochimie*.
- Leikin, S. L., D. Gallagher, T. R. Kinney, D. Sloane, P. Klug and W. Rida (1989).** "Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease." *Pediatrics* **84**(3): 500-508.
- Lindekleiv, H. M., K. Valen-Sendstad, M. K. Morgan, K. A. Mardal, K. Faulder, J. H. Magnus, K. Waterloo, B. Romner and T. Ingebrigtsen (2010).** "Sex differences in intracranial arterial bifurcations." *Gen Med* **7**(2): 149-155.
- Lipowsky, H. H., S. Usami and S. Chien (1980).** "In vivo measurements of "apparent viscosity" and microvessel hematocrit in the mesentery of the cat." *Microvasc Res* **19**(3): 297-319.
- Lonsdorfer, J., P. Bogui, D. Le Gallais, A. Lonsdorfer and I. Sofo (1990).** "Aptitude des drépanocytaires à l'effort physique." *Médecine d'Afrique Noire* **37**: 636-641.

- Machado, R. F., A. K. Mack, S. Martyr, C. Barnett, P. Macarthur, V. Sachdev, I. Ernst, L. A. Hunter, W. A. Coles, J. P. Nichols, G. J. Kato and M. T. Gladwin (2007).** "Severity of pulmonary hypertension during vaso-occlusive pain crisis and exercise in patients with sickle cell disease." *Br J Haematol* **136**(2): 319-325.
- Mackey, A. L., M. Kjaer, N. Charifi, J. Henriksson, J. Bojsen-Moller, L. Holm and F. Kadi (2009).** "Assessment of satellite cell number and activity status in human skeletal muscle biopsies." *Muscle Nerve* **40**(3): 455-465.
- Magalhaes, J., A. Ascensao, J. M. Soares, R. Ferreira, M. J. Neuparth, F. Marques and J. A. Duarte (2005).** "Acute and severe hypobaric hypoxia increases oxidative stress and impairs mitochondrial function in mouse skeletal muscle." *J Appl Physiol* **99**(4): 1247-1253.
- Mainwood, G. W. and J. M. Renaud (1985).** "The effect of acid-base balance on fatigue of skeletal muscle." *Can J Physiol Pharmacol* **63**(5): 403-416.
- Maitre, B., A. Mekontso-Dessap, A. Habibi, D. Bachir, F. Parent, B. Godeau and F. Galacteros (2011).** "[Pulmonary complications in adult sickle cell disease]." *Rev Mal Respir* **28**(2): 129-137.
- Malekgoudarzi, B. and S. Feffer (1999).** "Myonecrosis in sickle cell anemia." *N Engl J Med* **340**(6): 483.
- Mani, S. and T. P. Duffy (1993).** "Sickle myonecrosis revisited." *Am J Med* **95**(5): 525-530.
- Manwani, D. and P. S. Frenette (2013).** "Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies." *Blood* **122**(24): 3892-3898.
- Marlin, L., M. Etienne-Julan, D. Le Gallais and O. Hue (2005).** "Sickle cell trait in French West Indian elite sprint athletes." *Int J Sports Med* **26**(8): 622-625.
- Martin, T. W., I. M. Weisman, R. J. Zeballos and S. R. Stephenson (1989).** "Exercise and hypoxia increase sickling in venous blood from an exercising limb in individuals with sickle cell trait." *Am J Med* **87**(1): 48-56.
- Mauro, A. (1961).** "Satellite cell of skeletal muscle fibers." *J Biophys Biochem Cytol* **9**: 493-495.
- McCurdy, P. R. and A. S. Sherman (1978).** "Irreversibly sickled cells and red cell survival in sickle cell anemia: a study with both DF32P and 51CR." *Am J Med* **64**(2): 253-258.
- McHedlishvili, G. and N. Maeda (2001).** "Blood flow structure related to red cell flow: determinant of blood fluidity in narrow microvessels." *Jpn J Physiol* **51**(1): 19-30.
- Messonnier, L., H. Freund, L. Feasson, F. Prieur, J. Castells, C. Denis, M. T. Linossier, A. Geysant and J. R. Lacour (2001).** "Blood lactate exchange and removal abilities after relative high-intensity exercise: effects of training in normoxia and hypoxia." *Eur J Appl Physiol* **84**(5): 403-412.
- Morris, C. R., G. J. Kato, M. Poljakovic, X. Wang, W. C. Blackwelder, V. Sachdev, S. L. Hazen, E. P. Vichinsky, S. M. Morris, Jr. and M. T. Gladwin (2005).** "Dysregulated

arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease." *JAMA* **294**(1): 81-90.

Morris, C. R., F. A. Kuypers, S. Larkin, N. Sweeters, J. Simon, E. P. Vichinsky and L. A. Styles (2000). "Arginine therapy: a novel strategy to induce nitric oxide production in sickle cell disease." *Br J Haematol* **111**(2): 498-500.

Mounier, R., F. Chretien and B. Chazaud (2011). "Blood vessels and the satellite cell niche." *Curr Top Dev Biol* **96**: 121-138.

Mozzarelli, A., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1987). "Delay time of hemoglobin S polymerization prevents most cells from sickling in vivo." *Science* **237**(4814): 500-506.

Myrhage, R. and E. Eriksson (1984). Arrangement of the vascular bed in different types of skeletal muscles. *Skeletal Muscle Microcirculation*. F. M. Hammersen. Basel, Karger: 1-14.

Nagel, R. L. and H. M. Ranney (1990). "Genetic epidemiology of structural mutations of the beta-globin gene." *Semin Hematol* **27**(4): 342-359.

Nagel, R. L. and E. F. Roth, Jr. (1989). "Malaria and red cell genetic defects." *Blood* **74**(4): 1213-1221.

Nahavandi, M., J. P. Nichols, M. Hassan, A. Gandjbakhche and G. J. Kato (2009). "Near-infrared spectra absorbance of blood from sickle cell patients and normal individuals." *Hematology* **14**(1): 46-48.

Nahavandi, M., F. Tavakkoli, S. P. Hasan, M. Q. Wyche and O. Castro (2004). "Cerebral oximetry in patients with sickle cell disease." *Eur J Clin Invest* **34**(2): 143-148.

Nath, K. A., J. P. Grande, A. J. Croatt, E. Frank, N. M. Caplice, R. P. Hebbel and Z. S. Katusic (2005). "Transgenic sickle mice are markedly sensitive to renal ischemia-reperfusion injury." *Am J Pathol* **166**(4): 963-972.

Nath, K. A., J. P. Grande, J. J. Haggard, A. J. Croatt, Z. S. Katusic, A. Solovey and R. P. Hebbel (2001). "Oxidative stress and induction of heme oxygenase-1 in the kidney in sickle cell disease." *Am J Pathol* **158**(3): 893-903.

Nath, K. A., Z. S. Katusic and M. T. Gladwin (2004). "The perfusion paradox and vascular instability in sickle cell disease." *Microcirculation* **11**(2): 179-193.

Neonato, M. G., M. Guilloud-Bataille, P. Beauvais, P. Begue, M. Belloy, M. Benkerrou, R. Ducrocq, M. Maier-Redelsperger, M. de Montalembert, B. Quinet, J. Elion, J. Feingold and R. Girot (2000). "Acute clinical events in 299 homozygous sickle cell patients living in France. French Study Group on Sickle Cell Disease." *Eur J Haematol* **65**(3): 155-164.

Node, K., M. Kitakaze, H. Kosaka, T. Minamino, H. Funaya and M. Hori (1997). "Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by 17beta-estradiol: role of nitric oxide and calcium-activated potassium channels." *Circulation* **96**(6): 1953-1963.

Noguchi, C. T. (1984). "Polymerization in erythrocytes containing S and non-S hemoglobins." *Biophys J* **45**(6): 1153-1158.

- Ohene-Frempong, K., S. J. Weiner, L. A. Sleeper, S. T. Miller, S. Embury, J. W. Moohr, D. L. Wethers, C. H. Pegelow and F. M. Gill (1998).** "Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors." *Blood* **91**(1): 288-294.
- Olfert, I. M., E. C. Breen, O. Mathieu-Costello and P. D. Wagner (2001).** "Chronic hypoxia attenuates resting and exercise-induced VEGF, flt-1, and flk-1 mRNA levels in skeletal muscle." *J Appl Physiol* **90**(4): 1532-1538.
- Olivetti, G., G. Giordano, D. Corradi, M. Melissari, C. Lagrasta, S. R. Gambert and P. Anversa (1995).** "Gender differences and aging: effects on the human heart." *J Am Coll Cardiol* **26**(4): 1068-1079.
- Palek, J. and S. E. Lux (1983).** "Red cell membrane skeletal defects in hereditary and acquired hemolytic anemias." *Semin Hematol* **20**(3): 189-224.
- Parthasarathi, K. and H. H. Lipowsky (1999).** "Capillary recruitment in response to tissue hypoxia and its dependence on red blood cell deformability." *Am J Physiol* **277**(6 Pt 2): H2145-2157.
- Pauling, L., H. A. Itano and et al. (1949).** "Sickle cell anemia a molecular disease." *Science* **110**(2865): 543-548.
- Pegelow, C. H., L. Colangelo, M. Steinberg, E. C. Wright, J. Smith, G. Phillips and E. Vichinsky (1997).** "Natural history of blood pressure in sickle cell disease: risks for stroke and death associated with relative hypertension in sickle cell anemia." *Am J Med* **102**(2): 171-177.
- Pette, D. and G. Vrbova (1992).** "Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **120**: 115-202.
- Phelan, M., S. P. Perrine, M. Brauer and D. V. Faller (1995).** "Sickle erythrocytes, after sickling, regulate the expression of the endothelin-1 gene and protein in human endothelial cells in culture." *J Clin Invest* **96**(2): 1145-1151.
- Platt, O. S., D. J. Brambilla, W. F. Rosse, P. F. Milner, O. Castro, M. H. Steinberg and P. P. Klug (1994).** "Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death." *N Engl J Med* **330**(23): 1639-1644.
- Platt, O. S., B. D. Thorington, D. J. Brambilla, P. F. Milner, W. F. Rosse, E. Vichinsky and T. R. Kinney (1991).** "Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors." *N Engl J Med* **325**(1): 11-16.
- Powars, D., L. S. Chan and W. A. Schroeder (1990).** "The variable expression of sickle cell disease is genetically determined." *Semin Hematol* **27**(4): 360-376.
- Powars, D., B. Wilson, C. Imbus, C. Pegelow and J. Allen (1978).** "The natural history of stroke in sickle cell disease." *Am J Med* **65**(3): 461-471.
- Powars, D. R., J. N. Weiss, L. S. Chan and W. A. Schroeder (1984).** "Is there a threshold level of fetal hemoglobin that ameliorates morbidity in sickle cell anemia?" *Blood* **63**(4): 921-926.

- Powers, S. K. and M. J. Jackson (2008).** "Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production." *Physiol Rev* **88**(4): 1243-1276.
- Quemada, D. (1976).** "Hydrodynamique sanguine: hémorhéologie et écoulement du sang dans les petits vaisseaux." *Journal de Physique* **37**: 1-9.
- Quinn, C. T. and N. Ahmad (2005).** "Clinical correlates of steady-state oxyhaemoglobin desaturation in children who have sickle cell disease." *Br J Haematol* **131**(1): 129-134.
- Quinn, C. T. and J. W. Sargent (2008).** "Daytime steady-state haemoglobin desaturation is a risk factor for overt stroke in children with sickle cell anaemia." *Br J Haematol* **140**(3): 336-339.
- Quinn, C. T., J. Variste and M. M. Dowling (2009).** "Haemoglobin oxygen saturation is a determinant of cerebral artery blood flow velocity in children with sickle cell anaemia." *Br J Haematol* **145**(4): 500-505.
- Ravelojaona, M., L. Feasson, S. Oyono-Enguelle, L. Vincent, B. Djoubairou, C. Ewa'Sama Essoue and L. Messonnier (Article 1).** "Sickle cell anemia profoundly affects skeletal muscle and its microvasculature." *En soumission*.
- Rees, D. C., T. N. Williams and M. T. Gladwin (2010).** "Sickle-cell disease." *Lancet* **376**(9757): 2018-2031.
- Reiter, C. D., X. Wang, J. E. Tanus-Santos, N. Hogg, R. O. Cannon, 3rd, A. N. Schechter and M. T. Gladwin (2002).** "Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease." *Nat Med* **8**(12): 1383-1389.
- Remels, A. H., H. R. Gosker, P. Schrauwen, P. P. Hommelberg, P. Sliwinski, M. Polkey, J. Galdiz, E. F. Wouters, R. C. Langen and A. M. Schols (2010).** "TNF-alpha impairs regulation of muscle oxidative phenotype: implications for cachexia?" *FASEB J* **24**(12): 5052-5062.
- Rieder, R. F., S. Safaya, P. Gillette, S. Fryd, H. Hsu, J. G. Adams, 3rd and M. H. Steinberg (1991).** "Effect of beta-globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia." *Am J Hematol* **36**(3): 184-189.
- Rivilis, I., M. Milkiewicz, P. Boyd, J. Goldstein, M. D. Brown, S. Egginton, F. M. Hansen, O. Hudlicka and T. L. Haas (2002).** "Differential involvement of MMP-2 and VEGF during muscle stretch- versus shear stress-induced angiogenesis." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**(4): H1430-1438.
- Roth, S. M., G. F. Martel, F. M. Ivey, J. T. Lemmer, E. J. Metter, B. F. Hurley and M. A. Rogers (2000).** "Skeletal muscle satellite cell populations in healthy young and older men and women." *Anat Rec* **260**(4): 351-358.
- Rothman, S. M., K. H. Fulling and J. S. Nelson (1986).** "Sickle cell anemia and central nervous system infarction: a neuropathological study." *Ann Neurol* **20**(6): 684-690.
- Rybicki, A. C. and L. J. Benjamin (1998).** "Increased levels of endothelin-1 in plasma of sickle cell anemia patients." *Blood* **92**(7): 2594-2596.

- Schumacher, H. R., Jr., W. M. Murray and M. K. Dalinka (1990).** "Acute muscle injury complicating sickle cell crisis." *Semin Arthritis Rheum* **19**(4): 243-247.
- Schwarze, S. R., R. Weindruch and J. M. Aiken (1998).** "Oxidative stress and aging reduce COX I RNA and cytochrome oxidase activity in Drosophila." *Free Radic Biol Med* **25**(6): 740-747.
- Setty, B. N., M. J. Stuart, C. Dampier, D. Brodecki and J. L. Allen (2003).** "Hypoxaemia in sickle cell disease: biomarker modulation and relevance to pathophysiology." *Lancet* **362**(9394): 1450-1455.
- Shemin, D. and D. Rittenberg (1946).** "The life span of the human red blood cell." *J Biol Chem* **166**(2): 627-636.
- Shweiki, D., A. Itin, D. Soffer and E. Keshet (1992).** "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." *Nature* **359**(6398): 843-845.
- Sies, H. and E. Cadenas (1985).** "Oxidative stress: damage to intact cells and organs." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **311**(1152): 617-631.
- Silvestre, J. S., B. I. Levy and A. Tedgui (2008).** "Mechanisms of angiogenesis and remodelling of the microvasculature." *Cardiovasc Res* **78**(2): 201-202.
- Solovey, A., Y. Lin, P. Browne, S. Choong, E. Wayner and R. P. Hebbel (1997).** "Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia." *N Engl J Med* **337**(22): 1584-1590.
- Staron, R. S., E. S. Malicky, M. J. Leonardi, J. E. Falkel, F. C. Hagerman and G. A. Dudley (1990).** "Muscle hypertrophy and fast fiber type conversions in heavy resistance-trained women." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **60**(1): 71-79.
- Steinberg, M. H., D. H. Chui, G. J. Dover, P. Sebastiani and A. Alsultan (2014).** "Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full?" *Blood* **123**(4): 481-485.
- Steinberg, M. H. and S. H. Embury (1986).** "Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene." *Blood* **68**(5): 985-990.
- Steinberg, M. H., H. Hsu, R. L. Nagel, P. F. Milner, J. G. Adams, L. Benjamin, S. Fryd, P. Gillette, J. Gilman, O. Josifovska and et al. (1995).** "Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia." *Am J Hematol* **48**(3): 175-181.
- Sullivan, S. M. and R. N. Pittman (1987).** "Relationship between mitochondrial volume density and capillarity in hamster muscles." *Am J Physiol* **252**(1 Pt 2): H149-155.
- Sunshine, H. R., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1979).** "Gelation of sickle cell hemoglobin in mixtures with normal adult and fetal hemoglobins." *J Mol Biol* **133**(4): 435-467.
- Thiriet, P., J. Y. Le Hesran, D. Wouassi, E. Bitanga, D. Gozal and F. J. Louis (1994).** "Sickle cell trait performance in a prolonged race at high altitude." *Med Sci Sports Exerc* **26**(7): 914-918.

- Tomanek, R. J. (1990).** "Response of the coronary vasculature to myocardial hypertrophy." *J Am Coll Cardiol* **15**(3): 528-533.
- Turchetti, V., L. Boschi, G. Donati, G. Borgogni, D. Coppola, S. Dragoni, M. A. Bellini, S. Sicuro, V. M. Mastronuzzi and S. Forconi (2004).** "Endothelium and hemorheology." *Clin Hemorheol Microcirc* **30**(3-4): 289-295.
- Ueda, Y. and R. M. Bookchin (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* **104**(2): 146-159.
- Valeriano-Marcet, J. and L. D. Kerr (1991).** "Myonecrosis and myofibrosis as complications of sickle cell anemia." *Ann Intern Med* **115**(2): 99-101.
- Vekilov, P. G. (2007).** "Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia?" *Br J Haematol* **139**(2): 173-184.
- Verney, J., F. Kadi, N. Charifi, L. Feasson, M. A. Saafi, J. Castells, K. Piehl-Aulin and C. Denis (2008).** "Effects of combined lower body endurance and upper body resistance training on the satellite cell pool in elderly subjects." *Muscle Nerve* **38**(3): 1147-1154.
- Versi, E. (1993).** "Oestrogen and protection against myocardial ischaemia." *Lancet* **342**(8875): 871.
- Vicari, P., A. C. Choairy, G. C. Siufi, A. M. Arantes, J. R. Fonseca and M. S. Figueiredo (2004).** "Embolization of intracranial aneurysms and sickle cell disease." *Am J Hematol* **76**(1): 83-84.
- Vichinsky, E. (2002).** "New therapies in sickle cell disease." *Lancet* **360**(9333): 629-631.
- Vincent, L. (2010).** Caractéristiques structurales & fonctionnelles du muscle strié squelettique: Effets de l'Hémoglobine S et/ou de l'alpha-thalassémie. Thèse de Doctorat, Université Jean Monnet, Saint Etienne.
- Vincent, L., L. Feasson, S. Oyono-Enguelle, V. Banimbek, C. Denis, C. Guarneri, E. Aufradet, G. Monchanin, C. Martin, D. Gozal, M. Dohbobga, D. Wouassi, M. Garet, P. Thiriet and L. Messonnier (2010a).** "Remodeling of skeletal muscle microvasculature in sickle cell trait and alpha-thalassemia." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**(2): H375-384.
- Vincent, L., L. Feasson, S. Oyono-Enguelle, V. Banimbek, G. Monchanin, M. Dohbobga, D. Wouassi, C. Martin, D. Gozal, A. Geysant, P. Thiriet, C. Denis and L. Messonnier (2010b).** "Skeletal muscle structural and energetic characteristics in subjects with sickle cell trait, alpha-thalassemia, or dual hemoglobinopathy." *J Appl Physiol* **109**(3): 728-734.
- Wallace, K. L., M. A. Marshall, S. I. Ramos, J. A. Lannigan, J. J. Field, R. M. Strieter and J. Linden (2009).** "NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN-gamma and CXCR3 chemokines." *Blood* **114**(3): 667-676.
- Waltz, X., M. Hedreville, S. Sinnapah, Y. Lamarre, V. Soter, N. Lemonne, M. Etienne-Julan, E. Beltan, T. Chalabi, R. Chout, O. Hue, D. Mouguel, M. D. Hardy-Dessources and P. Connes (2012a).** "Delayed beneficial effect of acute exercise on red blood cell

aggregate strength in patients with sickle cell anemia." *Clin Hemorheol Microcirc* **52**(1): 15-26.

Waltz, X., A. Pichon, N. Lemonne, D. Mougenel, M. L. Lalanne-Mistrih, Y. Lamarre, V. Tarer, B. Tressieres, M. Etienne-Julan, M. D. Hardy-Dessources, O. Hue and P. Connes (2012b). "Normal muscle oxygen consumption and fatigability in sickle cell patients despite reduced microvascular oxygenation and hemorheological abnormalities." *PLoS One* **7**(12): e52471.

Weiner, C. P., I. Lizasoain, S. A. Baylis, R. G. Knowles, I. G. Charles and S. Moncada (1994). "Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11): 5212-5216.

West, M. S., D. Wethers, J. Smith and M. Steinberg (1992). "Laboratory profile of sickle cell disease: a cross-sectional analysis. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease." *J Clin Epidemiol* **45**(8): 893-909.

White, F. C., C. M. Bloor, M. D. McKirnan and S. M. Carroll (1998). "Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart." *J Appl Physiol* (1985) **85**(3): 1160-1168.

Whittom, F., J. Jobin, P. M. Simard, P. Leblanc, C. Simard, S. Bernard, R. Belleau and F. Maltais (1998). "Histochemical and morphological characteristics of the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Med Sci Sports Exerc* **30**(10): 1467-1474.

Widmaier, E. P., H. Raff and K. T. Strang (2008). *Human Physiology - The mechanisms of body function*. New York, McGraw-Hill Science. Eleventh edition.

Wood, K. C., R. P. Hebbel and D. N. Granger (2005). "Endothelial cell NADPH oxidase mediates the cerebral microvascular dysfunction in sickle cell transgenic mice." *FASEB J* **19**(8): 989-991.

Wood, K. C., L. L. Hsu and M. T. Gladwin (2008). "Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance." *Free Radic Biol Med* **44**(8): 1506-1528.

Young, R. C., Jr., R. E. Rachal, M. Del Pilar Aguinaga, B. L. Nelson, B. C. Kim, W. P. Winter and O. Castro (2000). "Automated oxyhemoglobin dissociation curve construction to assess sickle cell anemia therapy." *J Natl Med Assoc* **92**(9): 430-435.

Zhang, Q., L. Zhang, X. Yang, Y. Wan and J. Jia (2014). "The Effects of Exercise Preconditioning on Cerebral Blood Flow Change and Endothelin-1 Expression after Cerebral Ischemia in Rats." *J Stroke Cerebrovasc Dis*.

Ziada, A. M., O. Hudlicka, K. R. Tyler and A. J. Wright (1984). "The effect of long-term vasodilatation on capillary growth and performance in rabbit heart and skeletal muscle." *Cardiovasc Res* **18**(12): 724-732.

Zumstein, A., O. Mathieu, H. Howald and H. Hoppeler (1983). "Morphometric analysis of the capillary supply in skeletal muscles of trained and untrained subjects--its limitations in muscle biopsies." *Pflugers Arch* **397**(4): 277-283.

ANNEXES

I. Communications orales

IX^{èmes} Journées Annuelles de la Société Française de Myologie, (*Angers – Nov 2011*)

Ravelojaona M, Messonnier L, Oyono-Enguëllé S, Vincent L, Gourounas A & Féasson L. Identification histologique des répercussions musculaires de la drépanocytose chez l'homme (*poster flash*).

Réunion annuelle du Centre de Référence Maladies neuromusculaire rares, (*Lyon – Mars 2013*)

Ravelojaona M, Messonnier L & Féasson L. Analyse histologique des répercussions musculaires dans une hémoglobinopathie, la drépanocytose.

8^{ème} congrès sur la drépanocytose, (*Strasbourg – Avril 2013*)

Ravelojaona M, Messonnier L & Féasson L. Répercussions du portage de l'HbS sur les caractéristiques musculaires structurales, énergétiques et microvasculaires.

Journée du Réseau de Recherche Clinique sur la Drépanocytose, (*Paris – Oct 2013*)

Ravelojaona M, Messonnier L & Féasson L. Répercussions du portage de l'HbS sur les caractéristiques musculaires structurales, énergétiques et microvasculaires.

15^{ème} Congrès international de l'Association des Chercheurs en Activités Physiques et Sportives, (*Grenoble – Oct 2013*)

Ravelojaona M, Messonnier L & Féasson L. Répercussions du portage de l'HbS sur les caractéristiques musculaires structurales, énergétiques et microvasculaires.

II. Communications affichées

IX^{èmes} Journées Annuelles de la Société Française de Myologie, (*Angers – Nov 2011*)

Ravelojaona M, Messonnier L, Oyono-Enguëllé S, Vincent L, Gourounas A & Féasson L. Identification histologique des répercussions musculaires de la drépanocytose chez l'homme.

Journée IFRESIS, (*St Etienne – Nov 2011*)

Ravelojaona M, Messonnier L, Oyono-Enguëllé S, Vincent L, Gourounas A & Féasson L. Identification histologique des répercussions musculaires de la drépanocytose chez l'homme.

X^{èmes} Journées Annuelles de la Société Française de Myologie, (*Grenoble – Nov 2012*)

Ravelojaona M, Messonnier L & Féasson L. Remodelages microvasculaires dans le muscle d'hommes drépanocytaires – Etude des parois capillaires.

Journée de la Recherche EDSIS 488, (*St Etienne – Juin 2013*)

Ravelojaona M, Messonnier L & Féasson L. Remodelages microvasculaires dans le muscle d'hommes drépanocytaires – Etude des parois capillaires.

Journée IFRESIS, (*St Etienne – Nov 2013*)

Ravelojaona M, Messonnier L & Féasson L. Impact de la drépanocytose sur le muscle de sujets féminins drépanocytaires – Existe-t-il un effet genre ?

XI^{èmes} Journées Annuelles de la Société Française de Myologie, (Montpellier – Nov 2013)
Ravelojaona M, Messonnier L & Féasson L. Impact de la drépanocytose sur le muscle de sujets féminins drépanocytaires – Existe-t-il un effet genre ?

III. Fiches méthodologiques

Fiche méthodologique 1 : Histologie : Adénosine Tri-Phosphate (ATPase)

Fiche méthodologique 2 : Immunohistologie : A4 et N2

Fiche méthodologique 3 : Immunohistologie : CD56

Fiche méthodologique 4 : Fluorimétrie : Phosphofructokinase (PFK)

Fiche méthodologique 5 : Fluorimétrie : Lactate Déshydrogénase (LDH)

Fiche méthodologique 6 : Fluorimétrie : Créatine kinase (CK)

Fiche méthodologique 7 : Fluorimétrie : β -Hydroxy-Acyl Déshydrogénase (β -HAD)

Fiche méthodologique 8 : Fluorimétrie : Citrate Synthase (CS)

Fiche méthodologique 9 : Histoenzymologie : Cytochrome c Oxydase (COx)

Fiche méthodologique 10 : Immunohistologie : CD31

Fiche méthodologique 11 : Immunofluorescence : CD31/SM-MHC

Fiche méthodologique 12 : Immunohistologie : Van Gieson

Histologie : ATPase

L'Adénosine Triphosphate (ATPase) permet la fixation du substrat sur le site réactif, en libérant de l'énergie. Il existe des iso-enzymes musculaires de l'ATPase.

L'enzyme recherchée est décelée par son action sur un substrat intégré au cours de la manipulation. L'action de l'enzyme est alors mise en évidence par coloration.

1) Réactifs

Toutes les solutions doivent être préparées extemporanément avec de l'eau fraîche distillée.

Sodium barbital	0,1 M	1,0309 g / 50 mL	(réf. B-0500 / Sigma)
Chlorure de calcium	0,18 M	1,9978 g / 100 mL	(réf. 2388 / Merck)
Acétate de sodium	0,2 M	1,6406 g / 100 mL	(réf. S-7545 / Sigma)
Acide acétique glacial	0,2 M	1,2 mL / 100 mL	(réf. A-6283 / Sigma)
Chlorure de cobalt		1 g / 50 mL	(réf. 2539 / Merck)
Ammonium sulphide		0,5 mL / 50 mL	(réf. 1-05442 / Elevetec)
ATP			(réf. 127531 / Roche)

2) Préincubation

pH 10,4

Sodium barbital	0,1 M	40 mL
Chlorure de calcium	0,18 M	20 mL
H ₂ O distillée		200 mL

Ajuster le pH avec du NaOH 1N

10' à température ambiante

pH 4,55

Acétate de sodium	0,2 M	17 mL
Acide acétique	0,2 M	23 mL

Ajuster le pH avec une des 2 solutions

5' à température ambiante

pH 4,35

Acétate de sodium	0,2 M	14 mL
Acide acétique	0,2 M	26 mL

Ajuster le pH avec une des 2 solutions

10' à température ambiante

3) Incubation pH 9,4

Prélever 100 mL du tampon de préincubation alcaline à partir de la solution de pH 10,4

Ajouter 150 mg d'ATP

Ajuster le pH avec NaOH 1 N

Après préincubation, les lames sont lavées plusieurs fois avec H₂O distillée

Incubation à 37°C : 30' pour les lames préincubées à pH alcalin
40' pour les lames préincubées à pH acide

4) Coloration

3 rinçages à H₂O distillée

Plonger la lame dans du chlorure de cobalt à 2 % pendant 3'

3 rinçages à H₂O distillée

Plonger la lame dans du sulfure d'ammonium à 1 % pendant 1'

Déshydratation dans une succession de bains d'alcool absolus : 95° ; 100° ; 100°
quelques secondes

Xylène et monter à l'Eukitt

L'Eukitt et le Xylène sont deux produits complémentaires qui vont permettre de fixer
la lamelle sur la lame et ainsi protéger la coupe (Milieu de montage)

Laisser sécher la lame sous la hotte (environ 1h)

Immunohistologie : A4 et N2**1) Réactifs****Tampon Tris :**Solution mère : **Tris 0,5 M**

Tris (Sigma)	60,56 g
NaCl (Recaptur)	85,20 g
H ₂ O	500 mL
HCl (N)	370 mL

Ajuster à 1L de solution avec H₂Oou **Tris 1 M**

Tris (Sigma)	60,56 g
--------------	---------

Ajuster à 1L de solution avec H₂O
Acidifier avec HCl à pH 7,5Solution de travail : **Tris 0,05 M**

soit : 1/10 de Tris 0,5 M

soit : 1/20 de Tris 1 M

TSAB (Tris – Sérum Albumine Bovine) :

Préparation de 200 mL

1 mL SAB 30 % / 100 mL Tris 0,05 M

2) Préparation des lames

Sur lame préalablement fixées à l'acétone (10') et congelées, les sortir et les laisser **sécher** 1 heure à température ambiante
Réhydratation dans Tris 0,05 M pendant 5'
Puis dans le TSAB pendant 1 minutes
Sécher les lames

3) Préparation des anticorps (~ 100 µL / lame)**Ac primaire** : A4 et N2

dilution au 1/100 dans le TSAB

Incubation pendant 2 heures

Rinçage dans le Tris 0,05 M pendant 2 x 5'

Passage dans le TSAB pendant 5'

Sécher les lames

Ac secondaire : Dako P 260 (Lapin anti-souris)

dilution au 1/20 dans le TSAB

Incubation pendant 1 heure

Rinçage dans le Tris 0,05 M pendant 2 x 5'

Passage dans le TSAB pendant 5'

Sécher les lames

Ac tertiaire : Dako P 217 (Porc anti-lapin)
 dilution au 1/20 dans le TSAB
 Incubation pendant 1 heure
 Rinçage dans le Tris 0,05 M pendant 2 x 5'
 Passage dans le TSAB pendant 5'
 Sécher les lames

4) Préparation du chromogène (~ 150 µL / lame)

Si possible, préparation extemporanée sous la hotte dans l'ordre indiqué :
 (conservation maximale 8 jours à 4°C enveloppé dans l'aluminium)

Une pastille de DAB (DAB Dako S3000) diluée dans 10 mL de Tris puis :

Solution DAB + Tris (en mL)	2	4	6
H ₂ O ₂ à 30 % (en µL)	15	30	45

Incubation à température ambiante 2' à 3'
 Rinçage à l'eau courante pendant 15'
 Déshydratation dans l'alcool 3 x 5'
 Xylène ou méthylcyclohexane pendant 5'
 Montage à l'Eukitt

Immunohistologie : CD56**1) Réactifs****Tampon Tris :**Solution mère : **Tris 0,5 M**

Tris (Sigma)	60,56 g
NaCl (Recaptur)	85,20 g
H ₂ O	500 mL
HCl (N)	370 mL

Ajuster à 1L de solution avec H₂Oou **Tris 1 M**

Tris (Sigma)	60,56 g
--------------	---------

Ajuster à 1L de solution avec H₂O
Acidifier avec HCl à pH 7,5Solution de travail : **Tris 0,05 M**

soit : 1/10 de Tris 0,5 M

soit : 1/20 de Tris 1 M

TSAB (Tris – Sérum Albumine Bovine) :

Préparation de 200 mL

1 mL SAB 30 % / 100 mL Tris 0,05 M

2) Préparation des lames

Sur lame préalablement fixées à l'acétone (10') et congelées, les sortir et les laisser sécher 1 heure à température ambiante

Réhydratation dans Tris 0,05 M pendant 5'

Puis dans le TSAB pendant 1 minutes

Sécher les lames

3) Préparation des anticorps (~ 100 µL / lame)**Ac primaire** : CD56

dilution au 1/100 dans le TSAB

Incubation pendant 2 heures

Rinçage dans le Tris 0,05 M pendant 2 x 5'

Passage dans le TSAB pendant 5'

Sécher les lames

Ac secondaire : Dako P 260 (Lapin anti-souris)dilution au **1/20** dans le TSAB

Incubation pendant 1 heure

Rinçage dans le Tris 0,05 M pendant 2 x 5'

Passage dans le TSAB pendant 5'

Sécher les lames

Ac tertiaire : Dako P 217 (Porc anti-lapin)
 dilution au 1/20 dans le TSAB
 Incubation pendant 1 heure
 Rinçage dans le Tris 0,05 M pendant 2 x 5'
 Passage dans le TSAB pendant 5'
 Sécher les lames

4) Préparation du chromogène (~ 150 µL / lame)

Si possible, préparation extemporanée sous la hotte dans l'ordre indiqué :
 (conservation maximale 8 jours à 4°C enveloppé dans l'aluminium)

Une pastille de DAB (DAB Dako S3000) diluée dans 10 mL de Tris puis :

Solution DAB + Tris (en mL)	2	4	6
H ₂ O ₂ à 30 % (en µL)	15	30	45

Incubation à température ambiante 1'30
 Rinçage à l'eau courante pendant 15'

5) Contre coloration

Hémalum de Mayer filtré
 Incubation pendant 2'
 Rinçage à l'eau courante pendant 15'
 Déshydratation dans les 3 bains d'alcool 3 x 5'
 Xylène ou méthylcyclohexane pendant 5'
 Montage à l'Eukitt

Fluorimétrie : PFK**1) Principe de la mesure**

La production de fructose-1,6-diP par phosphofructokinase est couplée via 3 réactions en cascade, catalysées respectivement par aldolase, triose phosphate isomérase et glycérol phosphate déshydrogénase, à la consommation du substrat fluorescent NADH,H⁺. La baisse de fluorescence au cours du temps due à la consommation de NADH,H⁺, qui est directement proportionnelle à la vitesse de production de fructose-1,6-diphosphate par phosphofructokinase, est détectée au fluorimètre.



Les mesures doivent être réalisées sur des extraits protéiques obtenus le jour même. En effet, l'activité PFK diminue lorsque l'on multiplie les cycles congélation-décongélation.

2) Réactifs

* Tris Base 1M pH = 8,0

Peser 12,1 g de Tris Base (PM = 121,1 g/mol). Compléter jusqu'à 90 mL avec ΔH₂O. Ajuster à pH = 8,0. Ajuster le volume final à 100 mL avec ΔH₂O dans une éprouvette graduée.

* ATP 125 mM

Peser 756,5 mg d'ATP (Roche 519 979 ; PM = 605,2 g/mol). Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec ΔH₂O. Aliquoter sous 1 mL et conserver à -20°C.

* F-6-P 100 mM

Peser 304,1 mg de F-6-P (Roche 104 850 ; PM = 304,1 g/mol). Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec ΔH₂O. Aliquoter sous 1 mL et conserver à -20°C.

* NADH,H⁺ 5 mM

Peser 35,5 mg NADH,H⁺ (Roche 107 735; PM=709,4 g/mol). Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec ΔH₂O.

* MgCl₂ 500 mM

Peser 1,017 g de MgCl₂ (PM de MgCl₂, 6H₂O = 203,3 g/mol). Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec ΔH₂O. Aliquoter sous 1 mL et conserver à -20°C.

* β-mercaptoéthanol 14,2 M

Sigma M-7154 (à manipuler sous la hotte)

*Bovine Serum Albumine 10%

Peser 1 g de BSA (Sigma A-4503). Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec ΔH₂O. Aliquoter sous 1 mL et conserver à -20°C.

* Aldolase (Roche 102 652)

Rabbit muscle. 100 mg prot/10 mL et 9 unités/mg, soit 90 unités/mL

* Triose Phosphate Isomérase (Sigma T-2391)

Rabbit muscle. 1,3 mL ; 3,9 mg.prot/ml et 4385 unités/mg soit 17 102 U/mL

* Glycérol 3 Phosphate Déshydrogénase (Roche 127 752)

Rabbit muscle. 10 mg.prot/mL et 170 unités/mg soit 1700 U/mL

* Solution étalon F-1,6-diP 1 mM

Peser 8,12 mg de F-1,6-diP (Sigma F-6803; PM = 406,1 g/mol). Dissoudre dans 20 mL ΔH_2O . Aliquoter sous 1 mL et conserver à $-20^\circ C$.

3) Préparation du milieu réactionnel

Les concentrations finales indiquées correspondent aux concentrations finales dans 1 mL dans le tube de mesure.

Solution stock	Volume à rajouter	Concentration finale
Tris 1 M pH = 8.0	2,5 mL	50 mM
ATP 125 mM	500 μL	1,25 mM
MgCl ₂ 500 mM	500 μL	5 mM
β -mercaptoéthanol 14,4 M	7 μL	2 mM
BSA 10 %	250 μL	0,05 %
ALD(90 U/mL)	240 μL	0,45 unités/mL
TPI(17 102 U/mL)	30 μL	10 unités/mL
GOPDH (1700 U/mL)	25 μL	0,85 unités/mL

Ajuster le volume final à 48,5 mL avec ΔH_2O dans une éprouvette graduée.

Mettre à part 3,5 mL de ce milieu pour faire le 0 (Auto Blank) du fluorimètre.

4) Etalonnage

Milieu réactionnel contenant du NADH

Ajouter 400 μL de NADH,H⁺ 5 mM dans 39,6 mL du milieu réactionnel, soit une concentration finale de 50 μM ou 50 nmoles de NADH,H⁺/mL de MR.

Garder le milieu à l'abri de la lumière et dans la glace.

* Plan de pipetage pour l'étalonnage

nmoles F-1,6-diP	0	5	10	15	20	25
F-1,6-diP 1mM, μL	0	5	10	15	20	25
Equivalent nmoles NADH,H ⁺	0	10	20	30	40	50
ΔH_2O μL	30	25	20	15	10	5
MR avec enzymes et NADH,H ⁺ μL	970					

Auto Blank (0 Fluo) \rightarrow MR0 + 30 μL d' H_2O

Laisser stabiliser 20 minutes à température ambiante et de préférence à l'abri de la lumière.

Faire le 0 étalonnage (Spectre = 0 = MR sans NADH⁺ sans F-1,6-diP) sur le milieu

réactionnel sans NADH,H⁺ et le 150 sur le milieu réactionnel avec NADH,H⁺ (sans F-1,6-diP) (λ exc = 340 nm ; λ em = 450).

Calibration Fluorimètre :

3.1 Calibration 150

3.4 Facteur 1

3.5 Réponse 2 – Ratio OFF

2.1 Excitation 340nm Emission 450nm

5) Mesure de la vitesse de réaction

Pour le vaste externe humain utiliser des échantillons dilués au 1/10^{ème}.

Ajouter dans l'ordre les réactifs suivants :

970 μ l MR

5 μ l pur d'homogénat + 15 μ L d'H₂O. Laisser stabiliser 5 minutes à température ambiante.

déclencher la réaction en ajoutant 10 μ l de F-6-P 100 mM (soit 1 mM final).

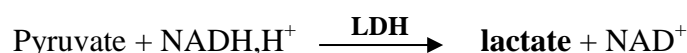
Suivre la réaction au fluorimètre (λ exc = 340 nm et λ em = 450 nm) pendant plusieurs minutes. La vitesse est calculée à partir de la portion linéaire de la courbe. Tenir compte de la stoechiométrie de la réaction (1 mole de F-1,6-diP consommée pour 2 moles de NADH,H⁺ consommées) pour calculer la vitesse de PFK.

Fluorimétrie : LDH

1) Principe de la mesure

L'activité de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) est mesurée pour évaluer l'activité du métabolisme glycolytique. La mesure de cette activité enzymatique s'effectue en suivant la réaction d'oxydation du NADH,H⁺. Cette réaction est catalysée par la LDH qui consomme NADH,H⁺ en présence de pyruvate et aboutit à la formation de NAD⁺ et de lactate.

Dans ces conditions, la diminution de la fluorescence liée au NADH,H⁺, mesurée au fluorimètre (Kontron Instruments, SFM 25), est directement proportionnelle à l'activité de la LDH.



2) Réactifs

* Tris 1M pH = 7,6 (Sigma T-1503)

Peser 12,1 g de Tris Base (PM = 121,1 g/mol). Compléter jusqu'à 90 mL avec ΔH₂O. Ajuster à pH = 8,0. Ajuster le volume final à 100 mL avec ΔH₂O dans une éprouvette graduée

* EDTA 200 mM (Sigma EDS)

Peser 584,4 mg d'EDTA (PM = 292,2 g/mol). Compléter jusqu'à 10 mL avec ΔH₂O dans une éprouvette graduée. Ajuster éventuellement le pH autour de 7,4-7,5 pour obtenir une meilleure dissolution. Aliquoter sous 500 μL et conserver à -20°C

* Pyruvate 100 mM (Sigma P-8574)

* NADH,H⁺ 5 mM (Boehringer 107727)

Peser 7,1 mg NADH,H⁺ (Roche 107 735; PM = 709,4 g/mol). Dissoudre dans un volume final de 2 mL avec ΔH₂O.

3) Préparation du milieu réactionnel

Les concentrations finales indiquées correspondent aux concentrations finales dans 1 ml dans le tube de mesure.

Solution stock	Volume à rajouter
Tris 1 M pH = 7,6	2,5 mL
EDTA 200 mM	500 μL
NADH,H ⁺	500 μL

Ajuster le volume final à 49 mL avec ΔH₂O dans une éprouvette graduée.

4) Etalonnage

* Préparation du milieu d'étalonnage

Solution stock	Volume à rajouter
Tris 1 M pH = 7,6	1 mL
EDTA 200 mM	200 μ L

Ajuster le volume final à 20mL avec Δ H₂O (dans un falcon).

On construit la courbe étalon avec des concentrations croissantes de NADH,H⁺ 1mM

* Plan de pipetage pour l'étalonnage

nmoles de NADH,H ⁺	0	10	20	30	40	50
NADH,H ⁺ 5mM, μ L	0	2	4	6	8	10
Δ H ₂ O	30	28	26	24	22	20
Milieu d'étalonnage, μ L						970 μ L

Mesurer au fluorimètre : λ exc = 340 nm

λ em = 450 nm

Attendre 5min avant de faire la droite d'étalon

5) Mesure de la vitesse de réaction

Ajouter dans l'ordre les réactifs suivants :

- 980 μ L MR
- 10 μ L d'extrait protéique (muscle lyophilisé dans milieu d'extraction)
- déclencher la réaction en ajoutant 10 μ L de 100mM pyruvate (1 μ M final)
- attendre 5min
- suivre la réaction au fluorimètre (λ exc = 340 nm et λ em = 450 nm) pendant une dizaine de minutes

Fluorimétrie : CK

1) Principe de la mesure

L'ATP produit par la créatine phosphokinase est couplé via 2 réactions en cascade, catalysées respectivement par hexokinase et glucose-6-phosphate déshydrogénase, à la formation du produit fluorescent NADPH,H⁺. L'augmentation de fluorescence au cours du temps due à la production de NADPH,H⁺, qui est directement proportionnelle à la vitesse de production d'ATP par glucose-6-phosphate déshydrogénase, est détectée au fluorimètre.



2) Réactifs

* Tris 1M pH = 8,0

Peser 12,1 g de Tris Base (PM = 121,1 g/mol). Compléter jusqu'à 90 mL avec ΔH₂O. Ajuster à pH = 8,0 Ajuster le volume final à 100 mL avec ΔH₂O dans une éprouvette graduée.

* CrP 0,833 M

Peser 1,363 g de CrP (Roche 621 714; PM=327,2 g/mol). Dissoudre dans un volume final de 5 mL avec ΔH₂O. Aliquoter sous 1 mL et conserver à -20°C.

* ADP 50 mM :

Peser 213,6 mg d'ADP (Sigma, A-2754, PM = 427,2). Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec ΔH₂O. Aliquoter sous 1 mL et conserver à -20°C.

* Glucose 100 mM :

Peser 180 mg de Glucose (PM = 180,16 g/mol). Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec ΔH₂O. Aliquoter sous 1 mL et conserver à -20°C.

* NADP⁺ 5 mM

Peser 39,4 mg de NADP⁺ (Roche 128 031; PM = 787,4 g/mol). Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec ΔH₂O. Aliquoter sous 1 mL et conserver à -20°C.

* ATP 2,5 mM :

Peser 15,13 mg d'ATP (Roche 519 979; PM = 605,2 g/mol). Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec ΔH₂O. Aliquoter sous 1 mL et conserver à -20°C.

* MgCl₂ 500 mM

Peser 1,017 g de MgCl₂ (PM de MgCl₂, 6H₂O = 203.3 g/mol). Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec ΔH₂O. Aliquoter sous 1 mL et conserver à -20°C.

* Dithiothreitol 250 mM :

Peser 385,5 mg de Dithiothreitol (Sigma D9163; PM = 154,2 g/mol). Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec ΔH₂O. Aliquoter sous 1 mL et conserver à -20°C.

*Bovine Serum Albumine 10 %

Peser 1 g de BSA (Sigma A-4503). Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec ΔH₂O. Aliquoter sous 1 mL et conserver à -20°C.

* Hexokinase (Roche 1 426 362)

Yeast overproducer suspension. 450 U/mg, 1500 unités/mL

* Glucose-6- P Déshydrogénase (Roche 127 655)

Yeast suspension. 5 mg.prot/mL et 350 unités/mg soit 1750 U/mL

3) Préparation du milieu réactionnel

Les concentrations finales indiquées correspondent aux concentrations finales dans 1 mL dans le tube de mesure.

Solution stock	Volume à rajouter	Concentration finale dans le tube 1 mL
Tris 1M pH = 8	2,5 mL	50 mM
ADP 50 mM	1 mL	1 mM
Glucose 100 mM	1 mL	2 mM
NADP ⁺ 5mM	1 mL	100 µM
MgCl ₂ 500 mM	1 mL	10 mM
DTT 250mM	1 mL	5 mM
BSA 10 %	100 µL	0,02 %
HK 1500 U/mL	100 µL	3 unités/mL
G6PDH 1750 U/mL	10 µL	0,35 unités/mL

Ajuster le volume final à 48,5 mL avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$ dans une éprouvette graduée

4) Etalonnage

* Plan de pipetage pour l'étalonnage

nmoles ATP	0	10	20	30	40	50
ATP 2,5 mM, µL	0	4	8	12	16	20
$\Delta\text{H}_2\text{O}$, µL	40	36	32	28	24	20
Milieu réactionnel, µL	960 µL					

Faire le point bas de la calibration sur le milieu sans ATP (soit sans NADPH, H⁺).

Faire le point haut de la calibration sur le milieu contenant 50 nmoles de ATP (soit 50 nmoles de NADPH, H⁺).

Attendre 5min.

5) Mesure de la vitesse de réaction

* Ajouter dans l'ordre les réactifs suivants :

960 µL MR contenant du NADH, H⁺ + 5µL d'H₂O

5 µL d'extrait à la dilution appropriée

déclencher la réaction en ajoutant 30 µL de CrP 0,833 M (soit 25 mM final)

attendre 5 minutes à température ambiante

suivre la réaction au fluorimètre (à partir de 30 unités) ($\lambda_{exc} = 340 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$) pendant plusieurs minutes.

Fluorimétrie β -HAD

1) Principe de la mesure

L'oxydation de NADH,H^+ par HAD s'accompagne d'une diminution de l'émission de fluorescence à 450 nm.



2) Réactifs

* Tris 1M pH = 7,0

Peser 15,76 g de Tris HCl (PM = 157,6 g/mol). Compléter jusqu'à 90 mL avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$. Ajuster à pH = 7,0. Ajuster le volume final à 100 mL avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$ dans une éprouvette graduée.

* EDTA 200 mM

Peser 584,4 mg d'EDTA (PM = 292,2 g/mol). Compléter jusqu'à 10 mL avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$ dans une éprouvette graduée. Ajuster éventuellement le pH autour de 7,4-7,5 pour obtenir une meilleure dissolution. Aliquoter sous 500 μL et conserver à -20°C .

* NADH,H^+ 5 mM

Peser 7,1 mg NADH,H^+ (Roche 107 735; PM = 709,4 g/mol). Dissoudre dans un volume final de 2 mL avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$.

* Triton X-100 10%

Pipeter 1 mL de Triton X-100. Compléter le volume jusqu'à 10 mL avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$ dans une éprouvette graduée. Conserver à température ambiante dans un Falcon 15 mL.

* Acéto-acétyl-CoA 5 mM

Reprendre 5 mg d'acéto-acétyl-CoA (Sigma A1625; PM = 971,6 g/mol) avec 1,03 mL $\Delta\text{H}_2\text{O}$. Aliquoter sous 50 μL et conserver à -20°C .

3) Etalonnage

* Milieu d'étalonnage

Solution stock	Volume à rajouter	Concentration finale
Tris 1M pH = 7,0	500 μL	50 M
EDTA 200 mM	100 μL	2 mM

Compléter à 10 mL avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$ dans une éprouvette graduée.

* Plan de pipetage pour l'étalonnage

nmoles de NADH,H^+	0	2	4	6	8	10
NADH,H^+ 5mM, μL	0	1.5	3	4.5	6	7.5
$\Delta\text{H}_2\text{O}$, μL	15	13.5	12	10.5	9	7.5
Milieu d'étalonnage, μL	735 μL					

Faire le point haut de la calibration sur le milieu contenant 10 nmoles de NADH,H^+ .

Faire le point bas de la calibration sur le milieu sans NADH,H^+ .

Laisser stabiliser 5' à l'abri de la lumière.

Mesurer au fluorimètre : $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$

4) Préparation du milieu réactionnel

Les concentrations finales indiquées correspondent aux concentrations finales dans 1 mL dans le tube de mesure.

Solution stock	Volume à rajouter	Concentration finale
Tris 1 M pH = 7,0	2,5 mL	50 mM
EDTA 200 mM	500 μ L	2 mM
NADH,H ⁺ 5mM	500 μ L	10 μ M

Ajuster le volume final à 50 mL avec Δ H₂O dans une éprouvette graduée. Le milieu réactionnel doit donner une valeur arbitraire de fluorescence similaire à celle obtenue pour le point haut d'étalonnage.

Garder le milieu à l'abri de la lumière et dans la glace.

5) *Mesure de la vitesse de réaction*

* Ajouter dans l'ordre les réactifs suivants :

726 μ L MR contenant du NADH,H⁺

7,5 μ L de Triton X-100 10 % au milieu réactionnel.

5 μ L d'extrait à la dilution appropriée.

attendre 5 minutes à température ambiante afin de permettre au Triton X-100 de solubiliser les membranes mitochondriales.

déclencher la réaction en ajoutant 11,5 μ L d'acéto-acétyl-CoA 5 mM (soit 75 nmoles d'acéto acétyl-CoA par ml de milieu de réactionnel).

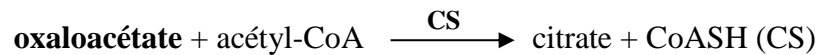
pour vérifier si une incubation se révèle nécessaire, sur le premier échantillon lire toutes les minutes dès l'ajout de l'acéto-acétyl-CoA. Repérer la plage de temps où la réaction est stable. (*donc voir si on doit attendre 2 minutes à température ambiante*)

suivre la réaction au fluorimètre (λ exc = 340 nm et λ em = 450 nm) pendant plusieurs minutes.

Fluorimétrie CS

1) Principe de la mesure

En présence de NAD^+ et de malate, MDH va produire de l'oxaloacétate et du NADH,H^+ . Les conditions expérimentales permettent d'obtenir rapidement une situation d'équilibre. La modification de l'équilibre réactionnel est rendue possible par la consommation d'oxaloacétate due à CS en présence d'acétyl-CoA. Il en résulte que la production de NADH,H^+ et d'oxaloacétate par MDH est proportionnelle à l'activité CS (asservissement de la réaction catalysée par MDH à la réaction catalysée par CS).



2) Réactifs

* Tris 1M pH = 8,0

Peser 12,1 g de Tris Base (PM = 121,1 g/mol). Compléter jusqu'à 90 mL avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$. Ajuster à pH = 8,0. Ajuster le volume final à 100 mL avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$ dans une éprouvette graduée.

* Acétyl-CoA 5 mM

Dissoudre 10 mg d'acétyl-CoA (Sigma A2056; PM = 809,6 g/mol) avec 2,45 mL $\Delta\text{H}_2\text{O}$. Aliquoter sous 50 μL et conserver à -20°C . **Attention** : l'acétyl-CoA une fois décongelé ne peut être recongelé.

* EDTA 200 mM

Peser 584,4 mg d'EDTA (PM = 292,2 g/mol). Compléter jusqu'à 10 mL avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$ dans une éprouvette graduée. Ajuster éventuellement le pH autour de 7,4-7,5 pour obtenir une meilleure dissolution. Aliquoter sous 500 μL et conserver à -20°C .

* Malate 250 mM

Peser 445 mg de malate (Sigma M-9138, PM = 178,1 g/mol). Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$ dans une éprouvette graduée. Aliquoter sous 250 μL et conserver à -20°C .

* MDH (Roche 127 256)

Pig heart. 1200 U/mg (5 mg/1 mL) soit 6000 U/mL. Vérifier la concentration en protéine et l'activité qui varie légèrement suivant les lots. Ajuster le volume pour le milieu réactionnel en fonction.

* NAD^+ 50 mM

Peser 331,7 mg NAD^+ (Roche 127 965; PM = 663,4 g/mol). Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$ dans une éprouvette graduée. Aliquoter sous 250 μL et conserver à -20°C .

* NADH,H^+ 1 mM

Peser 7,1 mg NADH,H^+ (Roche 107 735; PM = 709,4 g/mol). Noter la pesée exactement. Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$ dans une éprouvette graduée. Recalculer la concentration exacte en fonction de la pesée

* Triton X-100 10 %

Pipeter 1 mL de Triton X-100. Compléter le volume jusqu'à 10 mL avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$ dans une éprouvette graduée. Conserver à température ambiante dans un Falcon 15 mL.

3) Préparation du milieu réactionnel

Les concentrations finales indiquées correspondent aux concentrations finales dans 1 mL dans le tube de mesure.

Solution stock	Volume à rajouter	Concentration finale
Tris 1 M pH = 8,0	5 mL	100 mM
EDTA 200 mM	500 μ L	2 mM
Malate 250 mM	250 μ L	1,25 mM
NAD ⁺ 50 mM	250 μ L	0,25 mM
MDH 6000 unités/mL	50 μ L	6 unités/mL

Ajuster le volume final à 48,5 mL avec Δ H₂O dans une éprouvette graduée.

4) Etalonnage

On construit la courbe étalon avec des concentrations croissantes de NADH,H⁺ 1mM

* Plan de pipetage pour l'étalonnage

nmoles de NADH,H ⁺	0	2	4	6	8	10
NADH,H ⁺ 1mM, μ L	0	2	4	6	8	10
Δ H ₂ O	30	28	26	24	22	20
MR, μ L	970 μ L					

Mesurer au fluorimètre : λ exc = 340 nm

λ em = 450 nm

5) Mesure de la vitesse de réaction

* Ajouter dans l'ordre les réactifs suivants :

970 μ L MR

10 μ L de Triton X-100 10 % au milieu réactionnel.

5 μ L d'homogénat ou de suspension mitochondriale à la dilution appropriée +
5 μ L d'H₂O.

attendre 6' à température ambiante afin de permettre au Triton X-100 de solubiliser les membranes mitochondriales.

déclencher la réaction en ajoutant 10 μ L d'acétyl-CoA 5 mM (soit 50 nmoles d'acétyl-CoA par ml de milieu de réactionnel).

attendre 7 minutes à température ambiante (la réaction est plus stable et plus régulière)

suivre la réaction au fluorimètre (λ exc = 340 nm et λ em = 450 nm) pendant plusieurs minutes.

Histoenzymologie : COx

La Cytochrome C Oxydase est une enzyme que l'on retrouve surtout dans les fibres de type I. C'est le reflet du 4^{ème} complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale. On effectue la coloration COX afin de détecter un éventuel déficit de cette enzyme.

L'activité enzymatique normale de la cytochrome *c* oxydase est révélée par une coloration brune, issue de la précipitation de la Diaminobenzidine (DAB). Dans cette technique, l'oxydation du cytochrome C par l'activité de la COX est couplée à la DAB. La DAB devient insoluble et forme un précipiter brun démontrant ainsi l'activité enzymatique.

1) Réactifs

Phosphate de sodium disodique	(réf : S-0876 / Sigma)
Phosphate de sodium monosodique	(réf : S-0751 / Sigma)
3-3 Diaminobenzidine grade III	(réf : D-5637 / Sigma)
Cytochrome <i>c</i> type III	(réf : C-2506 / Sigma)
Catalase	(réf : C-100 / Sigma)
Saccharose / Sucrose	(réf : 477187 / Carlo Erba)

2) Tampon phosphate 0,05 M pH 7,3

Phosphate de sodium disodique	1,281 g
Phosphate de sodium monosodique	0,386 g
H ₂ O distillée	100 mL

3) Préparation de la solution de Diaminobenzidine

- Peser 10 mg de Diaminobenzidine
- Ajouter 18 mL de tampon phosphate 0,05 M
- Filtrer
- Mettre 5 µL de catalase dans 250 mL d'H₂O
- Couvrir et agiter pendant 10'

4) Milieu réactionnel

Cytochrome <i>c</i>	20 mg
Saccharose	1,5 g
Solution de catalase	2 mL
Solution de Diaminobenzidine	18 mL

- Mettre les lames à incuber dans cette solution 2h à température ambiante
- Rincer à l'H₂O distillée pendant 15'
- Déshydratation dans les 3 bains d'alcool : 95° ; 100° ; 100°
- Xylène
- Montage à l'Eukitt

Immunohistologie : CD31**1) Réactifs****Tampon Tris :**Solution mère : **Tris 0,5 M**

Tris (Sigma)	60,56 g
NaCl (Recaptur)	85,20 g
H ₂ O	500 mL
HCl (N)	370 mL

Ajuster à 1L de solution avec H₂Oou **Tris 1 M**

Tris (Sigma)	60,56 g
--------------	---------

Ajuster à 1L de solution avec H₂O

Acidifier avec HCl à pH 7,5

Solution de travail : **Tris 0,05 M**

soit : 1/10 de Tris 0,5 M

soit : 1/20 de Tris 1 M

TSAB (Tris – Sérum Albumine Bovine) :

Préparation de 200 mL

1 mL SAB 30% / 100 mL Tris 0,05 M

2) Préparation des lames

Sur lame préalablement fixées à l'acétone (10') et congelées, les sortir et les laisser sécher 1 heure à température ambiante

Réhydratation dans Tris 0,05 M pendant 5'

Puis dans le TSAB pendant 1 minutes

Sécher les lames

3) Préparation des anticorps (~ 100 µL / lame)**Ac primaire : CD31**

dilution au 1/20 dans le TSAB

Incubation pendant 2 heures

Rinçage dans le Tris 0,05 M pendant 2 x 5'

Passage dans le TSAB pendant 5'

Sécher les lames

Ac secondaire : Dako P 260 (Lapin anti-souris)dilution au **1/20** dans le TSAB

Incubation pendant 1 heure

Rinçage dans le Tris 0,05 M pendant 2 x 5'

Passage dans le TSAB pendant 5'

Sécher les lames

Ac tertiaire : Dako P 217 (Porc anti-lapin)

dilution au 1/20 dans le TSAB
 Incubation pendant 1 heure
 Rinçage dans le Tris 0,05 M pendant 2 x 5'
 Passage dans le TSAB pendant 5'
 Sécher les lames

4) Préparation du chromogène (~ 150 µL / lame)

Si possible, préparation extemporanée sous la hotte dans l'ordre indiqué :
 (conservation maximale 8 jours à 4°C enveloppé dans l'aluminium)

Une pastille de DAB (DAB Dako S3000) diluée dans 10 mL de Tris puis :

Solution DAB + Tris (en mL)	2	4	6
H ₂ O ₂ à 30 % (en µL)	15	30	45

Incubation à température ambiante 2'
 Rinçage à l'eau courante pendant 15'
 Déshydratation dans les 3 bains d'alcool 3 x 5'
 Xylène ou méthylcyclohexane pendant 5'
 Montage à l'Eukitt

Immunofluorescence : CD31/SM-MHC

Le marquage SM-MHC/CD31 permet de visualiser la présence ou l'absence de muscles lisses dans les parois capillaires.

Ce double marquage est une coloration, combinant : le CD31 en vert, marqueur des cellules endothéliales des capillaires, et le SM-MHC en rouge, marqueur des cellules musculaires lisses. Le DAPI en bleu, est le marqueur de tous les noyaux

1) Préparation du ParaFormaldéhyde 2 % (200 μ L / lame)

Diluer le formaldéhyde 37 % (dilution 18,5) avec de l'eau distillée
Fixation pendant 6 minutes

2) Préparation du PBS

Ajouter 5 pastilles de PBS dans 1 L d'eau distillée
Mettre sur l'agitateur jusqu'à dilution totale
Rincer les lames 3x 5 minutes dans le PBS

3) Préparation du non immune Bovine Serum Albumine 5 % - Goat Serum 5 % - PBS (200 μ L / lame)

Diluer le BSA 30 % (dilution x6) avec du PBS
Diluer le Goat Serum avec du PBS
Incubation pendant 30 minutes

4) Préparation du 1^{er} anticorps primaire (200 μ L / lame)

Diluer l'anticorps primaire SM-MHC (NCL-G-SERUM / Novacastra) au 1/100 avec du PBS
Incubation pendant (au moins) 2 heures à température ambiante
Rincer les lames 3 x 5' dans le PBS
Bloquer au BSA 5 % - GS 5 % - PBS pendant 15 minutes

5) Préparation du 1^{er} anticorps secondaire (200 μ L / lame)

Diluer l'anticorps secondaire Alexa Fluor 568 (abcam) au 1/150 avec du PBS
Incubation pendant (au moins) 1h30 à température ambiante et dans le noir
A partir de cette étape, travail dans le noir
Rincer les lames 3 x 5' dans le PBS
Bloquer au BSA 5 % - GS 5 % - PBS pendant 15 minutes

6) Préparation du 2nd anticorps primaire (200 μ L / lame)

Diluer l'anticorps primaire CD31 (M0823 / Dako) au 1/100 avec du PBS
Incubation pendant (au moins) 2 heures à température ambiante
Rincer les lames 3 x 5' dans le PBS
Bloquer au BSA 5 % - GS 5 % - PBS pendant 15 minutes

7) Préparation du 2nd anticorps secondaire (200 μ L / lame)

Diluer l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 (abcam) au 1/150 avec du PBS
Incubation pendant (au moins) 1h30 à température ambiante
Rincer les lames 3 x 5' dans le PBS
Monter les lames à l'Invitrogen + DAPI

Immunohistologie : Van Gieson***1) Réactifs***

Réactif de Baker	Solution de calcium chloride à 1 % dans formol 10 %
Réactif de Van Gieson	0,1 g de fushine acide dans 100 mL d'acide picrique saturé (1,82 g / 100 mL)

2) Coloration

Fixation dans le réactif de Baker pendant 10'

Rincer à l'eau

Coloration dans le réactif de Van Gieson pendant 2'

Xylène

Monter à l'Eukitt

Titre : Analyse histologique des répercussions musculaires, structurales, énergétiques et microvasculaires chez des hommes et des femmes drépanocytaires.

Résumé : La drépanocytose est une hémoglobinopathie essentiellement connue pour ses répercussions hématologiques, hémodynamiques et vasculaires chez les patients homozygotes (SCA). Bien que ces sujets présentent une intolérance à l'effort, la littérature est très pauvre concernant les répercussions musculaires de la maladie. Ce travail doctoral nous a permis de caractériser pour la première fois les répercussions structurales, énergétiques et microvasculaires du muscle d'hommes (étude 1) et de femmes (étude 2) drépanocytaires par rapport à des sujets SCT et contrôles (CON). Nos analyses histologiques et biochimiques ont mis en évidence chez les sujets SCA masculins une amyotrophie qui explique au moins en partie la diminution de l'IMC des SCA au dépend de la masse maigre. Nous avons également observé l'altération de plusieurs indices du métabolisme oxydatif (CS, β -HAD et COx) qui pourrait relever de la restriction d'approvisionnement et d'utilisation tissulaire en O₂ et expliquer en partie l'intolérance à l'effort. Enfin, un remodelage microvasculaire caractérisé par une raréfaction, une moindre tortuosité et une fragilisation des microvaisseaux a également été démontré. Ce remodelage microvasculaire pourrait contribuer à limiter le risque d'enclavement des hématies falciformées et ainsi réduire les risques de vaso-occlusions. La recherche de ces différents stigmates dans le muscle de la population féminine homologue a rapporté un remodelage musculaire similaire à celui observé chez les hommes SCA, mais ce dernier semble atténué, suggérant un effet genre.

Mots clés : Hémoglobine S, drépanocytose, amyotrophie, métabolisme énergétique oxydatif, remodelage microvasculaire, effet genre.

Title: Histology analyses of structural, energetics and microvascular repercussions of skeletal muscle in men and women with sickle cell anemia.

Abstract: Sickle cell anemia (SCA) is a hemoglobinopathy particularly known for its hematologic, hemodynamics and vascular repercussions. Although SCA patients are exercise intolerant, no studies have looked at muscle repercussions. We assessed repercussions of sickle cell anemia on skeletal muscle and its microvasculature in men (study 1) and women (study 2) for the first time. Our results showed that men with SCA displayed an amyotrophy which can at least partly explain the decrease of BMI at the expense of lean muscle mass. We also pointed out a decrease in muscle oxidative capacities (CS, β -HAD and COx) which could result from O₂ supply and utilization disorders and partly explain their exercise intolerance. Finally, a microvascular remodeling characterized by a rarefaction, a decrease in microvessel tortuosity and a microvessel weakening was also highlighted. This remodeling could contribute to maintain local blood flow and reduce risks of entrapment of sickle red blood cells in the microvasculature, hence reducing vaso-occlusive risks. Muscle repercussions on a similar female population testified of the same muscle remodeling as the one observed in men with SCA, but this latter seemed to happen at a lesser extent in women with SCA, suggesting a gender effect.

Key words: Hemoglobin S, sickle cell anemia, amyotrophy, muscle oxidative capacities, microvascular remodeling, gender effect.